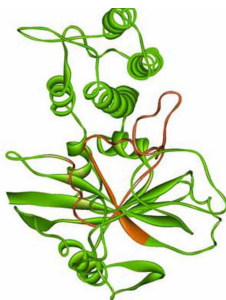




UNIVERSITA' DI NAPOLI FEDERICO II

**DOTTORATO DI RICERCA
BIOCHIMICA E BIOLOGIA CELLULARE E MOLECOLARE
XXI CICLO**

***IL SISTEMA NERVOSO CENTRALE DI OCTOPUS
VULGARIS : UN NUOVO MODELLO DI STUDIO PER LA
REAZIONE DI ADPRIBOSILAZIONE***



**Dottoranda : Emiliana Natale
Relatore: Prof.ssa Maria Rosaria
Faraone - Mennella**



UNIVERSITA' DI NAPOLI FEDERICO II

DOTTORATO DI RICERCA

BIOCHIMICA E BIOLOGIA CELLULARE E MOLECOLARE

XXI CICLO

**II SISTEMA NERVOSO CENTRALE DI *OCTOPUS*
VULGARIS : UN NUOVO MODELLO DI STUDIO PER LA
REAZIONE DI ADPRIBOSILAZIONE**

D O T T O R A N D A

EMILIANA NATALE

Relatore : Prof.ssa MARIA ROSARIA
FARAONE-MENNELLA

Coordinatore: Prof. GIUSEPPE
D'ALESSIO

ANNO ACCADEMICO 2007/ 2008

RINGRAZIAMENTI

A conclusione dei miei tre anni di dottorato, desidero ringraziare tutte le persone che mi hanno aiutato in questa esperienza formativa.

In primo luogo i miei genitori, che mi hanno appoggiata ed incoraggiata comprendendo e condividendo con me ogni momento sia di gioia che di difficoltà.

Esprimo profonda gratitudine alla Prof.ssa Maria Rosaria Faraone-Mennella, mio docente guida, che ha sostenuto il mio percorso scientifico sapendomi consigliare ed ascoltare con profonda dedizione.

Ringrazio di cuore la Prof.ssa Benedetta Farina per i consigli che mi ha dato sia in campo professionale che affettivo.

Ringrazio la Prof.ssa Anna Di Cosmo ed il Dott. Carlo Di Cristo per le informazioni forniteci sul sistema nervoso del cefalopode e per le analisi immunoistochimiche.

Ringrazio il Prof. Giuseppe D'Alessio, coordinatore del Corso di Dottorato, che ha seguito noi dottorandi con costante impegno.

Desidero ringraziare di cuore la Dott.ssa Anna De Maio che mi ha guidato nello sviluppo del lavoro di tesi con grande entusiasmo, rappresentando un punto di riferimento non solo professionale ma soprattutto umano. La ringrazio per la stima e l'amicizia dimostratami in qualsiasi momento del percorso fatto insieme. Ringrazio le Dott.sse Ferone Angela e Petrella Anna con cui in passato ho avuto il piacere di lavorare; la Dott.ssa Elena Porzio che ha reso piacevole se pur per un breve periodo la quotidianità del lavoro sperimentale.

Ringrazio le Dott.sse Arena Carmen e De Marco Anna per il loro affetto e la loro stima.

Infine, ringrazio di cuore tutti gli studenti che ho avuto modo di seguire

(Rosaria, Nunzio, Gennaro, Sergio), la cui collaborazione nel lavoro è stata utile e di stimolo per andare avanti. Un grazie va anche agli altri studenti Ottavia, Serena, Anna, le due Valentine, Eleonora e Massimiliano presenti nel laboratorio per l'affetto e la stima dimostratami.

SOMMARIO

In questo progetto di ricerca ci si è proposto di studiare l'eventuale presenza di una reazione di ADPriboseilazione nel sistema nervoso centrale (cervello, lobi e nervi ottici) di *Octopus vulgaris*. Il sistema nervoso del Cefalopode rappresenta un modello di studio ampiamente utilizzato in ogni campo di ricerca in quanto più semplice e facilmente utilizzabile di quello dei vertebrati, ma ugualmente idoneo a fornire utili informazioni per la sua complessità strutturale e funzionale.

Analisi preliminari immunoistochimiche, eseguite su sezioni trasversali di lobo ottico, trattate con anticorpi diretti contro il sito catalitico della PARP1, hanno evidenziato una forte immunopositività nella regione periferica del lobo, in corrispondenza degli strati di fibre nervose della zona plessiforme, indice di una attività ADPriboseilante a localizzazione citoplasmatica. In linea con questi risultati, la misura dell'attività enzimatica in tutti i distretti nervosi esaminati e la scoperta che nella frazione corrispondente ai nervi ottici (tratti di fibre nervose privi di corpi cellulari) sono misurabili livelli di attività enzimatica più elevati, hanno permesso di concludere sulla localizzazione citosolica della proteina ADPriboseilante.

La determinazione del PM (193kDa) e le caratteristiche del prodotto di reazione (polimero lineare di 30-35 unità di ADPR) hanno portato ad identificare l'enzima come v-PARP.

La fase successiva della ricerca ha riguardato il turnover del polimero, ottenendo evidenze di un'attività di tipo PARG (glicoidrolasica).

Infine, è stato identificato come unico accettore di PAR una componente di PM di 240kDa, che risulta costituita da vPARP ed actina, un complesso mediato da poli-ADPR. La formazione del complesso è influenzato

dall'ATP, cofattore essenziale per la polimerizzazione dell'actina. L'evidenza, inoltre, che l'actina sia fortemente modificata con PAR già endogenamente fa ipotizzare che la poli-ADPriboseilazione nel SNC del cefalopode riguardi specificamente la regolazione della funzione svolta dall'actina. Questi risultati sono di particolare interesse in quanto rappresentano il primo esempio in letteratura del coinvolgimento della v-PARP nella regolazione di un evento fisiologico diverso dal ruolo ipotizzato nel processo di detossificazione del citosol, quando l'enzima si trova associato alle particelle vaults.

SUMMARY

This research project deals with the presence of the ADP-ribosylating reaction in the central nervous system (brain, lobes and optic nerves) of *Octopus vulgaris*. The central nervous system of the Cephalopod represents a new model of study because even it is simpler than that of vertebrates, its structural and functional complexity is similar and allows to get interesting information. Immunohistochemistry carried out on the trasversal sections of optic lobes, with antibodies against the catalytic site of PARP1, gave evidence of a strong immunopositivity in the periferic region of the lobe. On the basis of these results, PARP activity was assayed in the different nervous districts and the highest levels of enzyme were found in the cytoplasmatic fraction.

The enzyme catalyzing the ADP-ribosylation reaction was identified as v-PARP by molecular weight (193kDa) and reaction products (linear poly-ADP-ribose, PAR, of 30-35 units ADPR).

The research followed studying the turnover of PAR. The cytoplasmic fraction showed to contain an ADP-ribosylating glycohydrolase activity, (PARG-like), that was strongly reduced by a known vertebrate PARG inhibitor. Covalent and noncovalent heteromodification involved a single acceptor (molecular weight = 240 kDa), cross-reacting either with anti-v-PARP, or anti-PAR or anti-actin antibodies, suggesting the formation of a v-PARP / actin complex, mediated by poly-ADP-ribose.

Both v-PARP activity and v-PARP/actin complex are influenced by ATP, essential cofactor of actin polymerization. These results suggest that poly-ADP-ribosylation of actin might act as a mechanism to regulate the polymerization states of this protein, and represents the first example of

PARP involvement in a physiological event different from the hypotesized role of detoxificant when associated to vault particles.

INDICE

INTRODUZIONE

<i>Sistema Nervoso Centrale di Octopus vulgaris</i>	pag.	1
<i>La reazione di poli-ADPriboseilazione</i>	"	5

SCOPO, FASI ED ARTICOLAZIONE

DELLA RICERCA	"	8
---------------	---	---

CAPITOLO I

<i>Identificazione e caratterizzazione dell'enzima</i>		
<i>ADP-ribosilante nel sistema nervoso centrale</i>		
<i>di Octopus vulgaris come PARP delle vaults</i>	"	11

MATERIALI & METODI

1) Preparazione di omogenati e frazioni citoplasmatiche da cervello, lobi e nervi ottici	"	15
2) Determinazione della concentrazione proteica	"	15
3) Determinazione dell'attività ADP-ribosilante	"	16
4) Espressione dell'enzima ADPriboseilante	"	16
a) Analisi elettroforetica di proteine su gel di poliacrilammide in SDS	"	16
b) Western Blotting ed immunorivelazione	"	17
5) Caratterizzazione del sistema ADPriboseilante	"	19
a) Isolamento dei nuclei da testicolo di ratto	"	19
b) Isolamento ed analisi del poli-ADPriboseio	"	19
c) Analisi delle proteine ADPriboseilate	"	20

RISULTATI	" 23
I. Determinazione dell'attività ADPribozilante in omogenati e frazioni citoplasmatiche da cervello, lobi e nervi ottici	" 23
II. Espressione dell'enzima ADPribozilante	" 25
III. Caratterizzazione del sistema ADPribozilante	" 27
a) Isolamento del poli-ADPribozio	" 27
b) Analisi delle proteine ADPribozilate	" 29
DISCUSSIONE	" 31
CAPITOLO II	" 33
<i>Attività poli-ADPR glicoidrolasica in SNC di Octopus vulgaris</i>	" 33
MATERIALI & METODI	" 37
1) Isolamento dei nuclei da testicolo di ratto	" 37
2) Preparazione della frazione citoplasmatica da cervello, lobi e nervi ottici	" 37
3) Determinazione della concentrazione proteica	" 37
4) Isolamento ed analisi del poli-ADPribozio	" 37
5) Determinazione dell'attività poli-ADPRglicoidrolasica	" 38
6) Determinazione dell'attività poli-ADPRglicoidrolasica a diverse concentrazioni e di frazione citoplasmatica da cervello e di ³² [P]-poli-ADPR	" 39
7) Determinazione dell'attività poli-ADPRglicoidrolasica	

in frazioni citoplasmatiche da cervello, in presenza ed assenza di ADP-HPD	" 39
RISULTATI	" 41
I . Determinazione dell'attività PARG	" 41
a) Attività della PARG a diverse concentrazioni di frazione citoplasmatica da cervello di <i>Octopus vulgaris</i>	" 41
b) Attività della PARG a diverse concentrazioni di poli-ADPR	" 42
c) Attività della PARG in presenza ed assenza dell'inibitore ADP-HPD	" 44
DISCUSSIONE	" 47
CAPITOLO III	" 49
<i>Analisi degli accettori di poli-ADPR</i>	
MATERIALI & METODI	" 53
1) Preparazione della frazione citoplasmatica da cervello, Lobi e Nervi Ottici	" 53
2) Determinazione della concentrazione proteica	" 53
3) Analisi elettroforetica di proteine accettrici di ADPR su gel di poliacrilammide in SDS	" 53
4) Western Blot	" 53
5) Isolamento e disgregazione del complesso	" 54

a) Cromatografia per gel filtrazione su colonna di Sephacryl S-100	" 54
b) Degradazione del poli-ADPR legato all'accettore di 240kDa	" 54
c) Disgregazione del complesso purificato	" 55
6) Poli-ADPR Blot	" 55
 RISULTATI	 " 57
I. Immunoblotting della frazione citoplasmatica da cervello Incubata nelle condizioni di saggio PARG con anticorpi anti-v-PARP, anti-poliADPR ed anti-actina	" 57
II. Isolamento e disgregazione del complesso	" 60
a) Purificazione del complesso di ADPR di 240kDa	" 60
b) Degradazione del poli-ADPR legato all'accettore di 240kDa	" 61
c) Disgregazione del complesso purificato ed immunorivelazione dei componenti del complesso disgregato	" 62
III. Poli-ADPR Blot	" 63
 DISCUSSIONE	 " 65

CAPITOLO IV

Modulazione dell'attività poli-ADPribosilante

nel SNC di Octopus vulgaris da parte dell'ATP " 67

MATERIALI & METODI " 71

1) Determinazione dell'attività ADP-ribosilante in presenza
ed assenza di ATP " 71

2) Determinazione dell'attività ADP-ribosilante in presenza
di actina e di ATP " 71

3) Analisi elettroforetica ed espressione dell'actina su gel
di poliacrilammide in SDS della frazione citoplasmatica
da cervello " 71

RISULTATI " 73

I. Determinazione dell'attività ADP-ribosilante in presenza
ed assenza di ATP " 73

II. Determinazione dell'attività ADP-ribosilante in presenza
ed assenza di actina e di ATP " 74

III. Immunorivelazione con anticorpi anti-actina in
frazioni citoplasmatiche con e senza ATP " 75

DISCUSSIONE " 77

BIBLIOGRAFIA " 79

INDICE DELLE FIGURE E TABELLE

Figura 1. Esemplare di <i>Octopus vulgaris</i>	pag. 1
Figura 2. Sistema Nervoso Centrale (SNC) di <i>Octopus vulgaris</i>	“ 2
Figura 3. Struttura dei lobi ottici di <i>Octopus vulgaris</i>	“ 3
Figura 4. Parti del Cervello di <i>Octopus</i>	“ 4
Figura 5. Rappresentazione schematica della struttura molecolare degli enzimi appartenenti alla famiglia delle PARP e della PARG	“ 6
Figura 6. Sezione sagittale del lobo ottico di <i>Octopus vulgaris</i>	“ 9
Figura 7. Struttura a barile delle “vaults” e apertura a fiore	“ 12
Tabella I. Attività enzimatica nelle diverse frazioni dal cervello, lobi e nervi ottici	“ 23
Tabella II. Attività enzimatica, su frazioni citoplasmatiche da cervello e lobi ottici in assenza ed in presenza di DNA	“ 24
Figura 8. SDS-PAGE 7% e immunorivelazione con anticorpi anti-v-PARP	“ 25
Figura 9. SDS-PAGE 12% e immunorivelazione con anticorpi anti-N-terminale (N-20) della PARP1	“ 26
Figura 10. Autoradiografia dei polimeri di ADPR	“ 28
Figura 11. SDS-PAGE 10% ed autoradiografia degli accettori proteici di ADPR	“ 29
Figura 12. La reazione di poli-ADPribosilazione (PARP) e la degradazione del polimero(PARG)	“ 33
Figura 13. Rappresentazione schematica della struttura molecolare dei domini delle tre isoforme	

dell'enzima PAR G	“ 34
Figura 14. Autoradiografia dei prodotti della reazione catalizzata dalla PARG ($[^{32}\text{P}]$ -Poli-ADPR= 8 pmoli) in frazioni citoplasmatiche da cervello (FCC) di <i>Octopus vulgaris</i> , a diversa concentrazione	“ 42
Figura 15. Autoradiografia dell'attività PARG a diverse concentrazioni di substrato	“ 43
Figura 16. Inibizione della PARG citoplasmatica (80 μg) da cervello di <i>Octopus vulgaris</i> in presenza di diverse concentrazioni dell'inibitore ADP-HPD, ed a concentrazione fissa di poli-ADPR (160 pmoli)	“ 44
Figura 17. Autoradiografia dei prodotti dell'attività PARG in presenza ed assenza dell'inibitore ADP-HPD (5mM) in frazioni citoplasmatiche da cervello di <i>Octopus vulgaris</i>	“ 45
Figura 18. SDS- PAGE ed immunorivelazione con anticorpi anti- v-PARP delle proteine; con anticorpi anti-poli-ADPR (C); con anticorpi anti-actina da frazioni citoplasmatiche di cervello	“ 59
Figura 19. SDS-PAGE 12% ed immunorivelazione con anticorpi anti-v-PARP ed anti-actina	“ 60
Figura 20. Autoradiografia della TLC dopo analisi, dell'accettore proteico di 240kDa sottoposto a trattamento nelle condizioni di saggio della PARG	“ 61
Figura 21. SDS-PAGE 12% ed immunorivelazione con	

anticorpi anti-v- PARP ed anti-actina delle proteine purificate	“ 62
Figura 22. SDS-PAGE 7 % ed immunorivelazione con anticorpi anti-poli-ADPR	“ 64
Figura 23. Struttura tridimensionale actina monomerica e filamentosa	“ 67
Figura 24. Attività enzimatica in frazioni citoplasmatiche da cervello in presenza ed assenza di ATP a diverse concentrazioni	“ 73
Figura 25. Determinazione dell'attività enzimatica (PARP) in frazioni citoplasmatiche di cervello con e senza actina ed ATP	“ 74
Figura 26. SDS-PAGE 7% ed immunorivelazione con anticorpi anti-actina	“ 76

ABBREVIAZIONI

3-ABA= 3-amminobenzammide

ADPR= adenosina difosfato ribosio

ADP-HPD=adenosina difosfato(idrossimetil)pirrolidindiolo

ATP= adenosina trifosfato

BSA= albumina di siero bovino

BRCA₁= [breast and ovarian cancer growth-suppressor protein]= proteina soppressore della crescita del cancro dell'ovario e della mammella

BRCT= dominio BRCA₁ carbossi-terminale

DNasi= deossiribonucleasi

DTT= ditiotreitolo

EDTA= acido etilendiamminotetracetico

EGTA=acidoetilenglicol-bis(β -amminoetil etere)tetracetico

IC₅₀= concentrazione inibitoria al 50%

MVP= major vaults protein

NAD⁺= nicotinammide adenina dinucleotide

NLS=segnale di localizzazione nucleare

NMDA=N-metil-D-aspartato

NO= ossido nitrico

NTR= Nuclei testicolo ratto

PAGE= Elettroforesi su Gel di poliacrilammide

PAR= polimero di ADPRibosio

PARG= poli-ADPRglicoidrolasi

PARP= poli-ADPRpolimerasi

PMSF= fenilmetilsulfonilfluoruro

RNP= particelle ribonucleoproteiche

SDS= sodiododecilsolfato

SNC= sistema nervoso centrale

TBE= tampone Tris-borato

TBS= tampone Tris-salino

TCA= acido tricloroacetico

TEP1= proteina associata alla telomerasi

TLC= cromatografia su strato sottile

TRIS = tris-idrossimetilamminometano

INTRODUZIONE

Il Sistema Nervoso Centrale di Octopus vulgaris

Octopus Vulgaris è un mollusco cefalopode bentonico, il cui Sistema Nervoso Centrale (SNC) presenta una complessità strutturale e funzionale simile a quella dei vertebrati (**Figura 1**). Il cervello, è suddiviso in 50 lobi, nei quali i neuroni sono disposti in una zona periferica o corticale, mentre le fibre nervose mielinizzate sono localizzate nella regione centrale.

Osservando dall'alto il SNC del cefalopode, immediatamente dopo la capsula cartilaginea segue il lobo verticale, a sua volta suddiviso in lobi, che separano una massa sopraesofagea da una sottoesofagea connesse lateralmente. (**Figura 2**).

La massa sottoesofagea è innervata da quella sopraesofagea, che va a sua volta ad innervare i muscoli.



Figura 1 – Esemplare di *Octopus vulgaris*

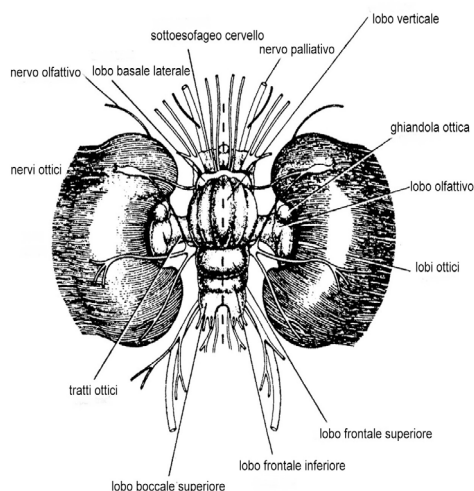


Figura 2- Sistema Nervoso Centrale (SNC) di *Octopus vulgaris* (veduta dall'alto) (1).

Dal lobo verticale si dipartono i tratti ottici, connessi ai lobi ottici reniformi da cui si originano i nervi ottici, costituiti da fasci di fibre nervose, privi di corpi cellulari collegati agli occhi (1,2).

I lobi ottici sono costituiti da una regione esterna detta “deep retina”, che costituisce il centro visivo ed una centrale detta “medulla”, sede della memoria.

La “deep retina” comprende strati di cellule granulari esterne ed interne separati da una zona plessiforme costituita, a sua volta, da 4 strati di fibre tangenziali e 4 di fibre radiali (**Figura 3**).

Secondo Young, i lobi verticali sono costituiti da due tipi di neuroni identici dal punto di vista morfologico: gli interneuroni amacrini e le cellule efferenti che stabiliscono tra loro sinapsi, formando una matrice simile all'ippocampo dei vertebrati (3-5). Il lobo verticale manifesta un potenziamento a lungo termine dei potenziali campi sinaptici

glutammatergici simili a quelli dei vertebrati. Questa evidenza suggerisce che, sia nei vertebrati che negli invertebrati, una evoluzione convergente abbia portato alla selezione di processi sinaptici dipendenti da attività simili, che mediano le complesse forme di apprendimento e memoria (5). In base allo schema del biologo Young (6), il sistema visivo dell'occhio del mollusco è organizzato su un grande Lobo Ottico (memoria visiva), attraversato da fibre ottiche, gustative e dolorifiche, e su 4 lobi sistemati in due coppie, una superiore ed una inferiore, denominati centri visivi (**Figura 4A**).

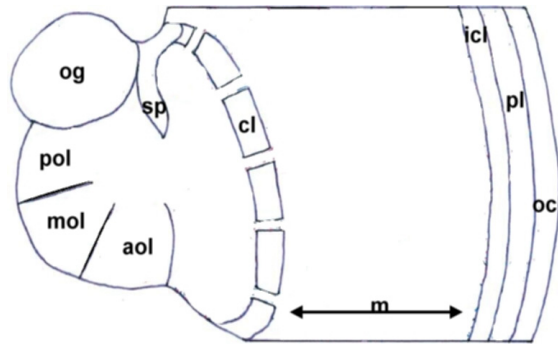


Figura 3 — Struttura dei lobi ottici di *Octopus vulgaris* (1)

cl = cellule dello strato della zona basale ; icl = cellule dello strato granulare interno; m = medulla; mol = lobulo olfattivo mediano ; ocl = cellule dello strato granulare esterno; og = ghiandole ottiche; pl = strato plessiforme ; aol = lobulo olfattivo anteriore; pol = lobulo olfattivo posteriore ; sp = spina del peduncolo del lobo.

Quando l'informazione visiva della retina raggiunge i lobi ottici essa può provocare due atti motori: l'estensione delle braccia per afferrare la preda, oppure l'arretramento delle braccia di fronte ad un predatore. Nella zona corticale più esterna sono presenti cellule classificatrici ed altre cellule nervose, alle quali fluisce l'informazione gustativa e dolorifica. I mnemoni o

cellule comando, invece sono cellule della memoria legate a quelle motorie che innervano i muscoli provocando l'avanzamento e/o l'arretramento dell'animale. Ogni cellula classificatrice comunica mediante biforcazione con due mnemoni, uno connesso alla cellula per il comando dell'attacco, l'altro per quello del ritiro. A seconda del ricordo dell'esperienza acquisita, i mnemoni aprono il circuito preposto all'attacco o quello preposto al ritiro, chiudendo necessariamente il circuito che attiva l'azione contraria (**Figura 4B**).

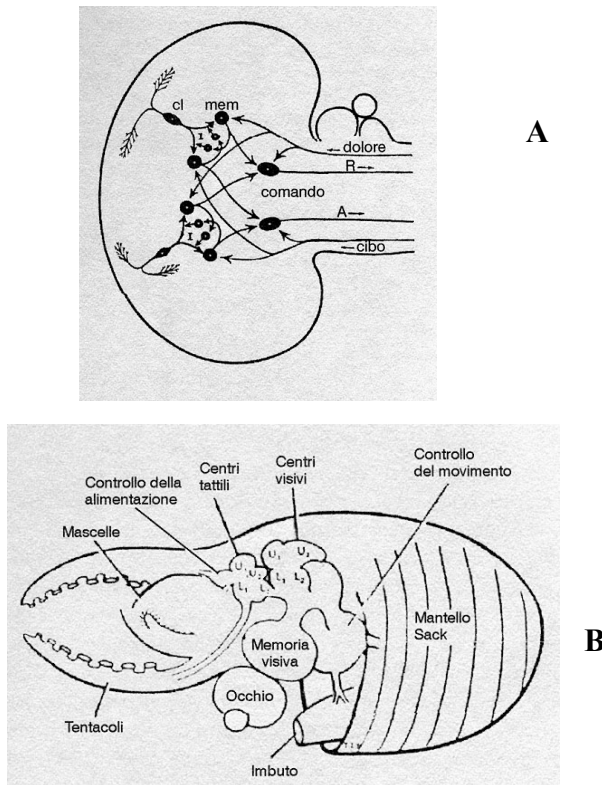


Figura 4 - A) Parti del Cervello di *Octopus* B) Schema del meccanismo di funzionamento del sistema della memoria nei lobi ottici (6)

A= cellule nervose attacco; cl = cellule classificatrici ;

R= cellule nervose ritiro ; I = cellule inibitorie.

La reazione di poli-ADPriboseilazione

La reazione di poli-ADPriboseilazione è una modificazione post-traduzionale di proteine catalizzata da enzimi specifici che trasferiscono unità di adenosina di fosfato ribosio (ADPR) dal β -NAD⁺ ai gruppi γ -carbossilici di residui di acido aspartico, glutammico e di lisina di diversi accettori proteici, (istoni, topoisomerasi I, II, la stessa PARP ecc.), con conseguente formazione di complessi ADPR–proteina monomerici o polimerici (7).

La poli-ADPriboseilazione è catalizzata da una famiglia di enzimi, le poli-ADPRpolimerasi (PARPs), e prevede diversi stadi:

1. idrolisi del legame N-glicosidico del NAD⁺ con formazione di ADPR;
2. attacco della prima unità di ADPR a specifici “target” proteici coinvolti in numerosi processi biochimici ;
3. allungamento della catena lineare di ADPR con formazione di legami glicosidici [1”-2’];
4. ramificazione del poli-ADPR con formazione di legami glicosidici (8).

Ad oggi, sono state identificate 18 PARP, tra le quali i membri meglio caratterizzati sono la PARP 1, la PARP 2, la PARP 3, le Tanchirasi 1 e 2 e la v-PARP, che differiscono per peso molecolare e localizzazione cellulare, ma che presentano un dominio catalitico altamente conservato (**Figura 5**) (9).

La **PARP-1** ha localizzazione nucleare, peso molecolare di circa 116 kDa e presenta quattro domini funzionali: un dominio N-terminale caratterizzato

da 2 motivi a dita di zinco di legame al DNA, quello di automodificazione che contiene il motivo BCRT e uno carbossi-terminale che rappresenta il dominio catalitico. Danni indotti al DNA da agenti alchilanti, radiazioni o radicali liberi provocano l'attivazione del dominio catalitico, responsabile dell'automodificazione dell'enzima e/o dell'ADPribosilazione delle diverse proteine, prossime ai filamenti interrotti del DNA.

La deplezione del NAD^+ indotta da un' attivazione prolungata della PARP, è responsabile di alterazioni a carico di importanti processi metabolici, quali la glicolisi e la respirazione (9).

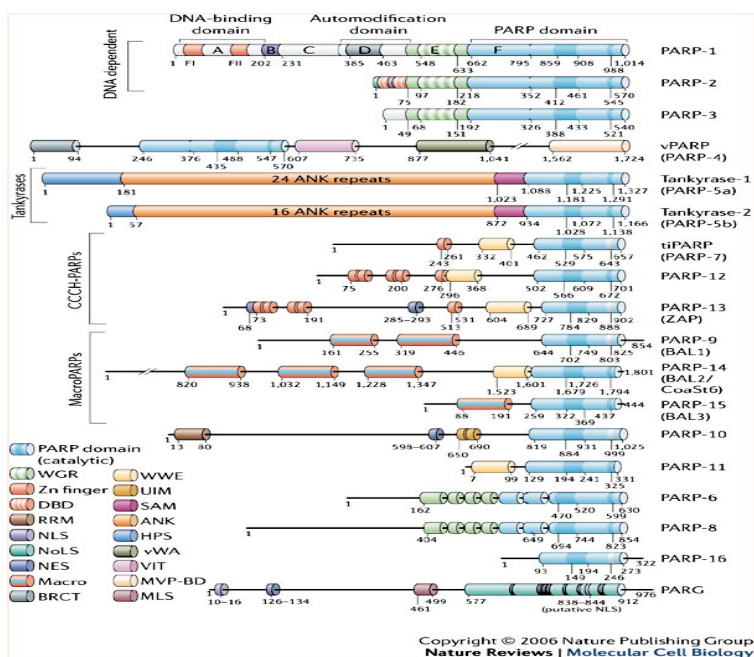


Figura 5 - Rappresentazione schematica della struttura molecolare degli enzimi appartenenti alla famiglia delle PARP e della PARG (9).

Tali alterazioni, provocando una riduzione dei livelli intracellulari di ATP, possono condurre la cellula a morte cellulare programmata o apoptosi (10).

La **PARP-2** (62 kDa), analogamente alla PARP1, ha localizzazione nucleare, è capace di legare il DNA da cui è attivata, pur non presentando il dominio a dita di zinco nel dominio N-terminale; ciò consente di ipotizzare differenti substrati per queste due proteine (11).

La **PARP-3**, strutturalmente la più piccola delle PARP e priva del dominio legante il DNA, è la componente del nucleo o cuore del centrosoma ed interviene nella progressione del ciclo cellulare durante la transizione G1 / S (9,12).

La **Tanchirasi 1** (detta anche PARP 5), di 142kDa, si lega alla sequenza telomerica TTAGGG del TRF1 regolando negativamente la lunghezza dei telomeri ed è, inoltre, coinvolta nel traffico vescicolare con l'apparato del Golgi.

Non è ancora nota la funzione e la localizzazione della **Tanchirasi 2**, una proteina di 130 kDa che esibisce più dell'80% di identità con la **Tanchirasi 1** (11,13,14).

La **v-PARP** (p-193), è una proteina di 193 kDa, localizzata nel citoplasma, nel quale può trovarsi sia in forma libera che associata alle vaults, che rappresentano i più grandi complessi ribonucleoproteici finora conosciuti (13 MDa) ed ampiamente diffusi negli eucarioti. La p-193, oltre ad automodificarsi, è responsabile, anche, dell'ADP-ribosilazione della Major Vault Protein (MVP), un altro componente di questo complesso (15).

SCOPO, FASI ED ARTICOLAZIONE DELLA RICERCA

Da qualche anno nel laboratorio dove è stato svolto il presente lavoro di tesi, il sistema nervoso centrale (SNC) di *Octopus vulgaris* è stato scelto come modello sperimentale nello studio della reazione di ADPRibosilazione (16). Il SNC di questo cefalopode è strutturalmente più semplice rispetto a quello dei vertebrati, anche se egualmente evoluto sotto l'aspetto funzionale. Infatti, tra l'altro, *Octopus vulgaris* possiede un sistema di trasmissione del segnale di tipo Glu/NMDA, NO, analogo a quello dei vertebrati superiori (16). Nell'ambito degli Invertebrati una correlazione tra memoria a lungo termine e poli-ADP-ribosilazione, era stata messa in evidenza dal gruppo della Cohen-Armon, che aveva dimostrato la presenza di un enzima ADP-ribosilante a localizzazione nucleare (~116kDa), nei neuroni del gasteropode *Aplysia*, un organismo filogeneticamente vicino al cefalopode (17).

Sulla base delle evidenze ottenute per *Aplysia*, in una fase preliminare della ricerca, sono stati preparati i nuclei da cervello e lobi ottici ed analizzati per l'attività ADP-ribosilante. I risultati di questa indagine indicavano che tale attività non era nei nuclei.

La scoperta, poi, di una elevata attività ADPRibosilante nei nervi ottici, (tratti di fibre nervose, privi di nucleo) confermata da analisi immunoistochimiche (**Figura 6**) ha fornito un'ulteriore evidenza riguardo alla localizzazione citoplasmatica dell'enzima responsabile dell'attività ADPRibosilante.

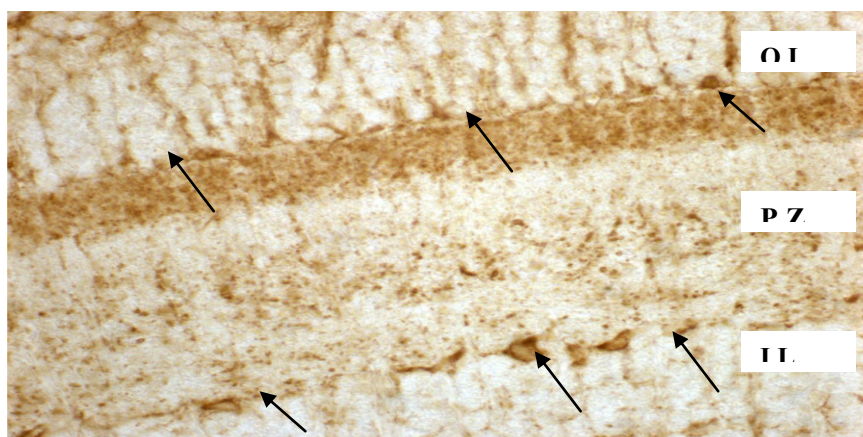


Figura 6 - Sezione sagittale del lobo ottico di *O. v.* trattata con anticorpi anti-sito-catalico PARP ottenuto in collaborazione Prof. Di Cosmo.

O.I. = strati di cellule granulari esterne della retina profonda ;

P.Z. = zona plessiforme;

I.L. = strati di cellule granulari interne della retina profonda.

Analisi elettroforetiche preliminari, seguite da immunoblotting con anticorpi anti-PARP 1 avevano inoltre indicato per l'enzima da Octopus un peso molecolare superiore a 116 kDa.

Alla luce di questi risultati, il lavoro di tesi ha avuto i seguenti obiettivi:

- Preparare differenti frazioni subcellulari.
- Identificare e caratterizzare l'enzima responsabile di tale attività, definendone le proprietà fisiche, chimiche e cinetiche (peso molecolare, cross reattività con anticorpi anti-PARP, dipendenza dal NAD e dal DNA, prodotti di reazione, ecc.).
- Dimostrare l'eventuale esistenza di una attività poli-ADPR glicoidrolasica (PARG), la quale, come precedentemente riferito, è in grado di garantire la reversibilità della reazione.
- Identificare e caratterizzare gli accettori di ADP-ribosio.

CAPITOLO I

Identificazione e caratterizzazione dell'enzima ADP-ribosilante nel Sistema Nervoso Centrale di *Octopus vulgaris* come PARP delle vaults.

A differenza delle altre PARP presenti nel nucleo e coinvolte nel meccanismo di riparazione, di trascrizione del DNA, nel processo di morte cellulare (necrosi e/o apoptosi), la v-PARP (p-193, 193 kDa) è l'unico enzima che presenti una localizzazione citoplasmatica.

L'analisi della sequenza di questa proteina ha indicato la presenza di quattro domini. Il 1° dominio (aa 1-94), identificato come dominio BRCT, è responsabile dell'interazione proteina-proteina ed è separato dal dominio catalitico da 115 aa (nella PARP 1 da 145 aa).

Il 2° dominio comprende gli aa 209-563, e mostra un'identità del 29% con la subunità catalitica della PARP1. Dall'analisi della struttura cristallina del frammento catalitico con peso di 40 kDa, è stato evidenziato, inoltre, che i residui formanti la tasca che lega il NAD^+ sono altamente conservati tra PARP 1 e p-193.

Il 3° dominio (aa 617-706 e 877-919) mostra una identità del 27-30% con l'inibitore dell' α -tripsina.

L'ultimo dominio (aa 1562-1724) è responsabile del legame con la Major Vault Protein (MVP) (15).

La v-PARP oltre ad essere presente nel citosol in forma libera, si trova anche associata a grandi particelle ribonucleoproteiche (13MDa), chiamate vaults.

Queste strutture più grandi di un ribosoma, sono presenti nel corso dell'evoluzione in animali filogeneticamente differenti quali Mammiferi,

Anfibi, Riccio di mare, Dictyostelium, Torpedo Marmorata, Molluschi e Protozoi (18).

Sono composte da un piccolo RNA (v-RNA non tradotto) e tre proteine di diverso peso molecolare: la MVP (100 kDa), la v-PARP (193 kDa) e la Tep1 (240 kDa). La v-PARP è in grado di automodificarsi e di ADP-ribosilare la MVP.

Queste particelle ribonucleoproteiche esibiscono una caratteristica forma a barile cavo, costituita di due parti identiche tra di loro, che possono aprirsi simmetricamente rispetto al suo asse centrale assumendo una struttura simile ad un fiore. Ciascuno di questi fiori è composto da otto petali rettangolari disposti intorno ad un anello centrale (19). Ogni petalo è costituito da sei copie di MVP, pertanto ogni complesso, è costituito da 96 MVP che costituiscono il barile, 8 v-PARP, 2 TEP1 ed un minimo di 6 v-RNA costituenti l'anello e le braccia della struttura a fiore (cap) (**Figura 7**) (20, 21).

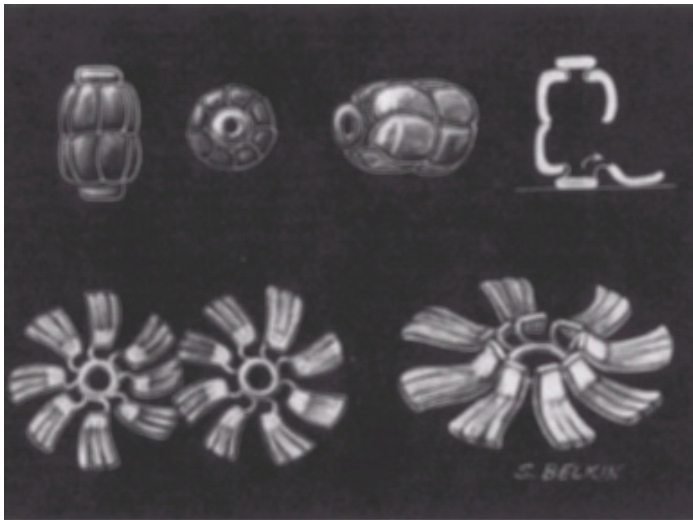


Figura 7 – Struttura a barile delle“*vaults*” e apertura a fiore (12)

Sebbene la localizzazione delle vaults sia principalmente citoplasmatica, la sua subpopolazione è stata evidenziata, mediante immunofluorescenza lungo gli apici dei fibroblasti, di fibre citoscheletriche ed in prossimità delle membrane nucleari o del complesso dei pori nucleari (22-27).

La funzione delle vaults, è ancora oggetto di numerosi studi. In alcune cellule tumorali e in cellule della risposta immunitaria, la loro espressione è in relazione ad una elevata varietà di citotossine non correlate fra loro strutturalmente e funzionalmente. E' stato anche ipotizzato che siano responsabili della resistenza cellulare ai farmaci e potrebbero essere coinvolte nella detossificazione del citosol o del nucleoplasma (28). Grazie alla loro caratteristica struttura e alla loro similitudine strutturale con quella del nucleoporo si suppone anche un loro possibile coinvolgimento nel trasporto bidirezionale di macromolecole tra nucleo e citosol. Per lo svolgimento di tale funzione la v-PARP è posta strategicamente nel "cap" del barile, in quanto, regolando l'apertura o la chiusura del complesso grazie alla poli-ADPribosilazione delle proteine che lo compongono, consente l'entrata e l'uscita delle macromolecole all'interno del barile (14). Infine, l'associazione delle vaults grazie al "cap" con filamenti di actina e/o microtubuli, consentirebbe il trasporto delle sostanze inglobate nel barile, anche a notevoli distanze (28).

Le esperienze preliminari sui tessuti nervosi di Octopus davano indicazioni sulla localizzazione citoplasmatica dell'attività ADP-ribosilante, per cui la ricerca è stata inizialmente indirizzata all'analisi delle frazioni citoplasmatiche, al fine di identificare il tipo di enzima PARP coinvolto.

MATERIALI E METODI

1) Preparazione di omogenati e frazioni citoplasmatiche da cervello, lobi e nervi ottici

Gli omogenati da cervello, lobi e nervi ottici sono stati preparati alla temperatura di 0-4 °C. Le soluzioni, tamponate in Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, contengono EDTA 1mM, EGTA 1mM, β -mercaptoetanololo 1 mM, spermidina 0,75 mM, spermina 0,15 mM, PMSF 1 mM, cocktail inibitori di proteasi (5-10 μ g/ml) (tampone A). Ciascun tessuto sopra indicato (rispettivamente di 0,71g, 0,75g, 0,05g) è stato sminuzzato, omogeneizzato al Polytron in tampone A con aggiunta di saccarosio 0,25 M (1:5 ; p/v), filtrato su garza sterile. Dopo filtrazione, l'omogenato è stato centrifugato a 1500 x g per 15 minuti, con un apparecchio Beckman TH Y-25 (rotore JA ; 25-50).

Il sopranatante raccolto rappresenta la “frazione citoplasmatica” del cervello, lobi e nervi ottici.

2) Determinazione della concentrazione proteica

La concentrazione delle proteine presenti nelle frazioni ottenute da ciascun tessuto, è stata determinata utilizzando il reattivo di Pierce (Bio-Rad), seguendo il protocollo riportato sulla confezione (29). L'albumina di siero bovino (BSA, 1mg/ml) è stata utilizzata per l'elaborazione della curva di calibrazione.

3) Determinazione dell'attività ADP-ribosilante

L'attività ADPribosilante, in tutte le frazioni e sezioni del SNC di *Octopus vulgaris*, è stata determinata sulla base dell'incorporazione di radioattività nel materiale TCA-precipitabile, in presenza e assenza di DNA da testicolo di salmone, digerito con DNasi (1mg/ml), in presenza di MgCl₂ mediante incubazione a 37 °C per 30 minuti.

La miscela di reazione (50 µl), contenente la frazione in esame (20 µg), Tris-HCl 0,5 M, pH 8,0, MgCl₂ 50 mM e DTT 10 mM, è stata incubata in presenza di

³²P-NAD 0,64 mM (10.000 cpm/nmole), per 10 minuti a temperatura ambiente (condizioni standard di saggio) (30).

Dopo incubazione della miscela, la reazione è stata bloccata in ghiaccio per 30 minuti, mediante l'aggiunta di TCA 30% finale. Il precipitato così ottenuto è stato lavato, mediante filtrazione su carta Millipore del tipo HAWP00010 (0,45 µm), con 20-30 volumi di TCA 7% freddo.

La radioattività associata al filtro è stata misurata in uno scintillatore in fase liquida (Bechman LS 1701), dopo aggiunta di 5 ml di liquido di scintillazione (Lipofluor, Lumac).

L'attività enzimatica è espressa in mUnità (mU), dove 1mU rappresenta la quantità di enzima richiesto per trasformare 1 nmole di NAD⁺ in ADPR in un minuto, a pH 8,0, e alla temperatura di incubazione di 25°C.

4) Espressione dell'enzima ADPribosilante

a) Analisi elettroforetica di proteine su gel di poliacrilammide in SDS

Le analisi elettroforetiche degli omogenati, e delle frazioni citoplasmatiche ottenute da cervello, lobi e nervi ottici (20 µg di proteine)

sono state effettuate su gel di poliacrilammide (al 7% o al 10%) in un sistema Tris-Glicina-SDS, come descritto da Nicholas e Goodwin (31).

I gel sono stati successivamente colorati con Coomassie Brilliant Blue R – 250 0,25%, in acido acetico 10% - metanolo 50% e decolorati in una soluzione contenente acido acetico 10% (v/v) e metanolo 10% (v/v).

b)Western blotting ed immunorivelazione

L'analisi elettroforetica delle frazioni è stata effettuata caricando le proteine in duplicato. Dopo corsa elettroforetica, una parte del gel è stato colorato con Coomassie Brilliant Blue R, mentre le proteine non colorate sono state trasferite su un foglio di nitrocellulosa (Bio- Rad 0,2 µm) mediante elettroblotting (Bio-Rad Transblot System), utilizzando una corrente costante di 200 mA, in tampone Tris 0,025 M, glicina 0,192 M, pH 8,6, contenente SDS 0,025 %, a 4 °C per 2 h. Come controllo, sono stati trasferiti anche gli standard di peso molecolare (Bio- Rad).

Il filtro di nitrocellulosa, contenente la proteine in esame, è stato sottoposto a ripetuti lavaggi con tampone Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM (TBS) contenente Tween 0,5% e successivamente incubato, a temperatura ambiente per 3 h, in TBS contenente Tween 0,5% e gelatina 3%, per saturare i siti aspecifici di legame.

In seguito, è stata effettuata una incubazione a temperatura ambiente per tutta la notte, in presenza di anticorpi monoclonali anti-v-PARP (diluiti 1:100 v/v) in TBS-Tween 0,5% e gelatina 0,3%. Dopo ripetuti lavaggi in TBS-Tween 0,05%, il filtro di nitrocellulosa è stato trattato per 1h a temperatura ambiente con anticorpi secondari (anti-mouse; diluito 1:1000

v/v), coniugato con la perossidasi alcalina in TBS-Tween 0,05% e gelatina 0,3%.

La rivelazione dell'attività perossidasi è stata eseguita per chemiluminescenza, utilizzando un kit Pierce (Super Signal West Dura). L'acquisizione e l'analisi delle immagini sono state effettuate utilizzando il Chemidoc (Bio-Rad) ed il programma Quantity One.

In una esperienza analoga tutte le frazioni citoplasmatiche esaminate sono state sottoposte ad immunoblotting con anticorpi anti- PARP (N-20) (diluito 1:1000 v/v); utilizzando come anticorpo secondario l'anti-goat (diluito 1:10000 v/v). Nuclei di testicoli di ratto (20 µg di proteine) sono stati utilizzati come controllo positivo, dal momento che l'anticorpo primario riconosce il dominio a dita di zinco legante il DNA della PARP 1.

5) Caratterizzazione del sistema ADPribozilante

a) Isolamento dei nuclei da testicolo di ratto

Per isolare i nuclei da testicolo di ratti è stato utilizzato il metodo di Adamietz e coll., apportando ad esso alcune modifiche (32).

Tutte le operazioni sono state condotte alla temperatura di 0-4 °C.

Il tessuto è stato sminuzzato ed omogeneizzato al Dounce in tampone A, (1:4 ; p/v) contenente Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 10mM, MgCl₂ 3,0mM, PMSF 0,5 mM, NP-40 0,5%, cocktail inibitori di proteasi (5-10 µg /ml). In seguito a centrifugazione a 200xg per 10min a 4°C, si è ottenuto un precipitato che è stato risospeso nel tampone A (1:2; p/v) e diluito 1:1 (v/v) con il tampone B contenente Tris-HCl 15 mM, pH 7,5, saccarosio 0,2M, MnCl₂ 10 mM, PMSF 1 mM, cocktail di inibitori di proteasi (5-10 µg /ml).

In seguito, il precipitato è stato stratificato su cuscino di saccarosio costituito da tampone A, con l'aggiunta di saccarosio 0,88 M, e centrifugato a 3000xg per 10 min., a 4 °C. I nuclei, che appaiono sul fondo dei tubi come residuo bianco, sono stati raccolti e lavati in tampone B, contenente il tampone A, EGTA 1mM e saccarosio 0,3M.

Dopo centrifugazione a 3000xg per 10min a 4°C, il pellet è stato risospeso in tampone BT, contenente il tampone B con l'aggiunta di triton X-100 1% (1:2; p /v).

b) Isolamento ed analisi del poli-ADPribozio

Sospensioni nucleari di ratto e frazioni citoplasmatiche dei tre distretti nervosi di *Octopus vulgaris*, (Materiali & Metodi, paragrafo 1 e 5a, SEZIONE I), corrispondenti a 100 µg di proteine sono state aggiunte ad una

miscela, contenente Tris-HCl 0,5 M, pH 8,0, MgCl₂ 50mM, DTT 10mM (Mix5X), in presenza di [³²P]- NAD⁺ 0,41mM (100.000 cpm/nmole) in un volume finale di 50μl, e incubate a 30°C per 10 min.

Al termine dell'incubazione, la reazione è stata interrotta in ghiaccio per 30min., e i campioni precipitati TCA 30% freddo per 60min. Il precipitato è stato centrifugato a 4000 rpm , a 4°C per 20 min. Successivamente sono stati effettuati tre lavaggi in etanolo 100% freddo.

Il precipitato TCA ottenuto è stato risospeso in tampone Tris-NaOH 10mM, pH12, ed EDTA 1mM, pH8,0, ed incubato per 3 h a 60°C. Tale trattamento determina il distacco del poli-ADPR dalle proteine a cui è legato covalentemente. La componente proteica è stata successivamente allontanata mediante estrazione con una miscela costituita da cloroformio /alcool isoamilico (24:1, v/v) e il poli-ADPR recuperato nella fase acquosa è stato analizzato su gel di poliacrilammide 20% ad alta risoluzione.

L'elettroforesi è stata condotta in tampone Tris-borato 89mM pH 8,3, EDTA 2mM, a 8-12 W, per circa 4 h. Dopo la corsa elettroforetica il gel è stato essiccato ed esposto ad uno schermo di fosforescenza per 24h.

L'esposizione e l'analisi quantitativa delle immagini sono state effettuate utilizzando il Personal Imager FX (Biorad) ed il programma Quantity One.

c) Analisi delle proteine ADPribosilate

Le frazioni citoplasmatiche da cervello e da lobi ottici, e, l'omogenato dei nervi ottici (20 μg di proteine) sono stati incubati con ³²P-NAD 0,64 mM (40000 cpm /nmole), nelle condizioni standard di saggio. Ciascuna

miscela di reazione è stata analizzata mediante elettroforesi su gel al 10% e al 12% di poliacrilammide in SDS, a pH 8,6.

Il gel è stato colorato con Coomassie R – 250 0,05 %, decolorato ed essiccato mediante essiccatore per gel (Bio-Rad , modello 583), ed esposto, per la notte, in cassetta con schermo (Bio-Rad).

La radioattività associata alle proteine è stata rivelata mediante Personal Imager FX (Bio-Rad), utilizzando il programma Quantity One.

RISULTATI

I. Determinazione dell'attività ADPribosilante in omogenati e frazioni citoplasmatiche da cervello, lobi e nervi ottici

E' stata saggiata l'attività ADPribosilante in omogenati e frazioni citoplasmatiche provenienti da cervello, lobi e nervi ottici del SNC di *Octopus vulgaris*, in condizioni standard di saggio (**Tabella I**).

I risultati hanno indicato che la concentrazione più elevata di enzima è presente nei nervi ottici, mentre nel cervello e nei lobi ottici le mU enzimatiche per grammo di tessuto risultano paragonabili. Inoltre, nelle frazioni citoplasmatiche sia del cervello che dei lobi ottici è presente la maggiore percentuale di attività ADPribosilante (>90%).

Tabella I -Attività enzimatica nelle diverse frazioni dal cervello, lobi e nervi ottici (20 µg di proteine)

Campione	mU/g tessuto	% mU / g tessuto
Omogenato cervello	5,29	100
Frazione citoplasmatica	4,9	92
Omogenato lobi	5,3	100
Frazione citoplasmatica	4,8	90
Omogenato Nervi	11,6	100
Frazione citoplasmatica	10,6	91,4

Al fine di prendere in esame se la presenza del DNA potesse influenzare l'attività ADPribosilante, sono stati condotti saggi di attività, su frazioni citoplasmatiche di cervello e di lobi ottici, in condizioni standard, in assenza ed in presenza di DNA frammentato. L'aggiunta alla miscela di saggio di DNA non ha prodotto alcun incremento dell'attività enzimatica, come riportato in (**Tabella II**).

Tabella II - Attività enzimatica, su frazioni citoplasmatiche da cervello e lobi ottici (20 µg di proteine), in assenza ed in presenza di DNA.

Frazione citoplasmatica	mU tot	mU/g tessuto	mU/mg prot.	% mU / g tessuto
cervello				
- DNA	2,7	3,8	0,107	100
Cervello				
+ DNA	2,56	3,6	0,101	94,7
lobi ottici				
- DNA	2,38	5,01	0,095	100
lobi ottici				
+ DNA	2,37	5,01	0,095	100

II. Espressione dell'enzima ADPribozilante

In **Figura 8**, sono riportati i risultati dell'analisi elettroforetica delle proteine da frazioni citoplasmatiche di cervello, lobi e nervi ottici. A parità di proteine analizzate (20 μ g), i profili elettroforetici risultano qualitativamente simili nei distretti esaminati.

L'immunoblotting degli stessi campioni (**Figura 8**), ottenuto utilizzando anticorpi anti-v-PARP, ha mostrato che è presente un evidente segnale di immunoreattività in corrispondenza di una proteina con peso molecolare di circa 193 kDa ed ha indicato la presenza di un secondo segnale a più alto peso molecolare di circa 240kDa.

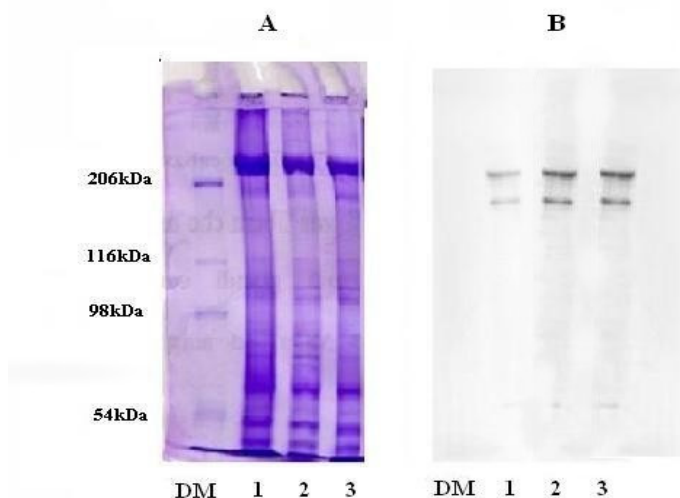


Figura 8 - SDS-PAGE 7% (A) e immunorivelazione con anticorpi anti-v-PARP (B).

DM= Dalton Markers ;1= Frazione citoplasmatica di cervello

2= Frazione citoplasmatica di lobi ottici ; 3= Frazione citoplasmatica di nervi ottici.

L'incubazione con anticorpi anti-PARP (N-20), diretti contro il dominio N-terminale della PARP-1, non ha prodotto nessuna risposta in tutte le frazioni del cefalopode. Al contrario, un forte segnale immunopositivo (116kDa) si osserva nei nuclei da testicolo di ratto utilizzati come riferimento (**Figura 9**).

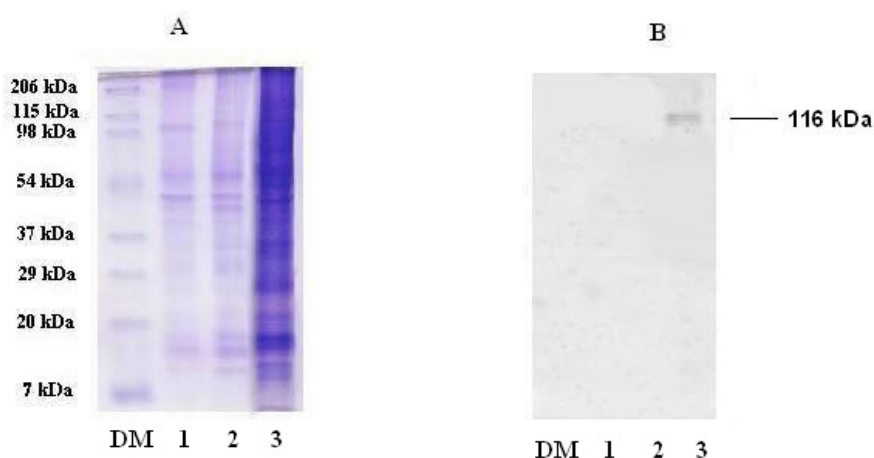


Figura 9 - SDS-PAGE 12% (A) e immunorivelazione con anticorpi anti-N-terminale (N-20) della PARP1 (B).
DM= Dalton Markers ; 1= Frazione citoplasmatica di cervello
2= Frazione citoplasmatica di lobi ottici ; 3= Sospensione nucleare da testicolo di ratto.

III. Caratterizzazione del sistema ADPribosilante

a) Isolamento del poli-ADPribosio

Dopo trattamento del materiale acido-insolubile marcato con alcali (Materiali e Metodi, paragrafo 5b, Sezione I), sono stati analizzati su gel i prodotti derivanti dagli addotti ADPR-proteina da frazioni citoplasmatiche di cervello, lobi e nervi ottici. E' noto che l'azione della PARP può produrre monomeri, oligomeri o polimeri di ADPR. Il poli-ADPR isolato da nuclei di testicolo di ratto è stato utilizzato come riferimento (**Figura 10**).

L'analisi autoradiografica ha evidenziato che in *Octopus vulgaris* il prodotto della reazione è rappresentato da un oligomero lineare costituito da circa 30-35 unità di ADP-ribosio.

Come molecole di riferimento, sono state utilizzate: il [^{32}P]-NAD che migra come un tetramero di ADPR; il Bromofenolo (B) con migrazione corrispondente ad un oligomero di 8 unità di ADPR; lo Xilencianolo (X) con migrazione corrispondente ad un oligomero di 20 unità di ADPR.

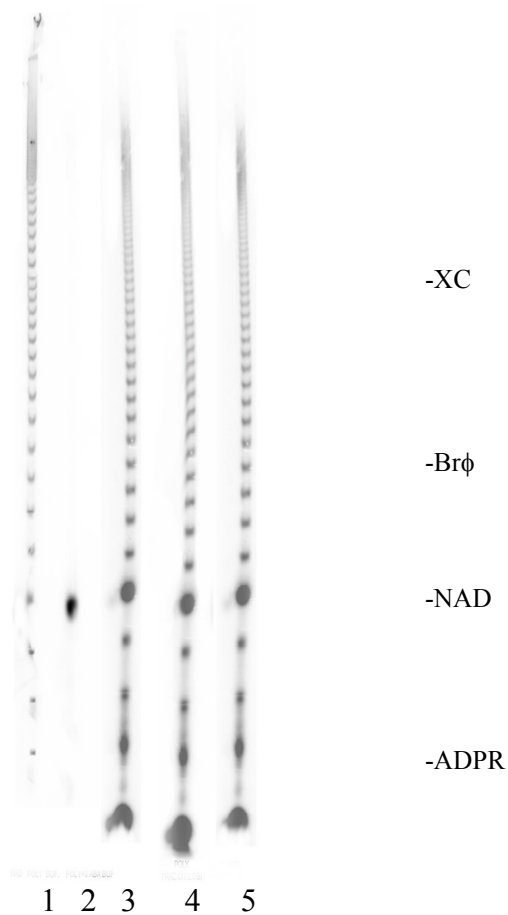


Figura 10 - Autoradiografia dei polimeri di ADPR

1= [^{32}P]-poli-ADPR da nuclei di testicolo di ratto

2= [^{32}P]- NAD^+

3= [^{32}P]-poli-ADPR da frazione citoplasmatica di cervello di O.v.

4= [^{32}P]- poli-ADPR da frazione citoplasmatica di lobi ottici di O.v.

5= [^{32}P]-poli-ADPR da frazione citoplasmatica di nervi ottici di O.v.

XC= Xilencianolo (oligomero di 20 unità)

Brφ = Bromofenolo (oligomero di 8 unità).

b)Analisi delle proteine ADPriboseilate

Sono state prese in esame le frazioni TCA-insolubili provenienti dal citoplasma del cervello, dai lobi ottici e dall'omogenato dei nervi, dopo incubazione con [32 P]-NAD (Materiali e Metodi, paragrafo 5c, SEZIONE I). L'analisi delle proteine marcate, presenti nelle diverse frazioni, è stata effettuata mediante SDS-PAGE, e la successiva analisi autoradiografica ha messo in evidenza gli accettori proteici di ADPriboseio (**Figura 11**).

Non si sono osservate differenze qualitative e quantitative significative a livello dei pattern proteici dei campioni analizzati mediante SDS-PAGE, mentre l'analisi autoradiografica ha mostrato un unico accettore di ADPriboseio con peso molecolare di ~ 240 kDa.

Una elevata radioattività è localizzata al “top” del gel, di cui è da identificare la precisa natura.

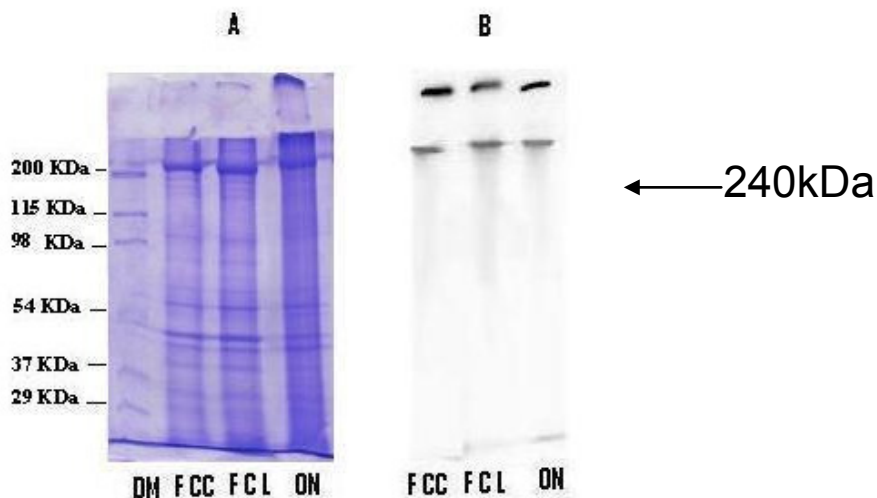


Figura 11 -SDS-PAGE 10% dei campioni e delle frazioni indicate (20 μ g di proteine) (A) e autoradiografia degli accettori proteici di ADPR (B); DM = Dalton Markers ; FCL = Frazione citoplasmatica di lobi ; ON = Omogenato da nervi.

DISCUSSIONE

L'analisi dell'attività enzimatica sugli omogenati e sulle frazioni citoplasmatiche provenienti da cervello, lobi e nervi ottici di *Octopus vulgaris* ha indicato che l'attività ADPribosilante è localizzata prevalentemente nella frazione citoplasmatica, suggerendo che la reazione sia catalizzata da un enzima diverso da PARP-1 e PARP-2. Questi risultati sono stati confermati dal fatto che l'attività non è influenzata dalla presenza di DNA (**Tabella II**), e dai saggi di attività enzimatica eseguiti sui nervi ottici, che, come già riferito, rappresentano tratti terminali di fibre nervose privi di corpi cellulari. In questo distretto, i livelli di attività risultano più elevati che negli altri tessuti (**Tabella I**).

Mediante analisi di immunoreattività è stato dimostrato, successivamente, che l'enzima responsabile dell'attività ADP-ribosilante nel cefalopode è la v-PARP (193kDa)

La seconda banda immunoreattiva evidenziata e corrispondente ad un peso molecolare di circa 240kDa, ha dato chiare indicazioni di essere composta da v-PARP, per la reazione con gli anticorpi specifici, e da poli-ADPribosio, come dimostrano i dati autoradiografici (**Figura 11**).

La differenza di peso molecolare con l'enzima nativo (193 kDa) non può essere giustificata ipotizzando soltanto una forma automodificata dell'enzima, in considerazione del fatto che il poli-ADP-ribosio di 30-35 unità, sintetizzato dalla v-PARP di Octopus (**Figura 10**), corrisponderebbe ad un peso molecolare di 15-18 kDa.

Pertanto si è ipotizzato che la banda a 240 kDa potrebbe rappresentare un complesso proteico di cui, oltre alla v-PARP e al poli-ADPR, potrebbe far parte un'altra componente proteica a basso peso molecolare (**Figura 8**).

CAPITOLO II

Attività poli-ADPR glicoidrolasica in SNC di *Octopus vulgaris*

La reversibilità della reazione di poli-ADPriboseilazione è garantita dalla poli-ADPR glicoidrolasi (PARG) e dalla ADP-ribosio-proteina liasi. Attraverso la sua doppia attività endo-ed eso-glicoidrolasica la PARG, enzima a localizzazione nucleare e/o citoplasmatica, catalizza l'idrolisi di legami glicosidici tra le unità di ADPR, sia all'estremità che ai punti di ramificazione del polimero. Infine, la ADPR-proteina liasi scinde il residuo prossimale di ADPR sulla proteina accettrice (**Figura 12**) (33). E' stato recentemente riportato, che anche la PARG, come la PARP1, possiede un sito di taglio per la caspasi 3, a riprova che un accurato controllo del sistema di poli-ADPriboseilazione è indispensabile per l'esecuzione della morte cellulare programmata e per l'eliminazione delle cellule irrimediabilmente danneggiate (34,35).

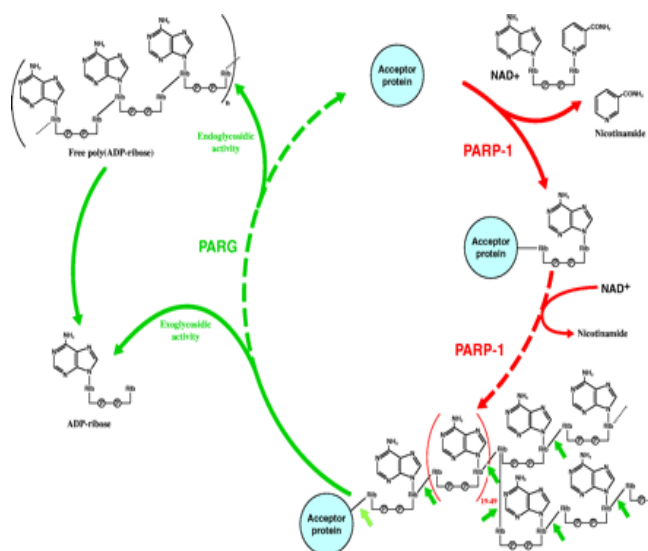


Figura 12 -La reazione di poli-ADPriboseilazione (PARP) e la degradazione del polimero (PARG) (36).

Recentemente sono state individuate tre isoforme dell'enzima PARG, una di 110 kDa, una di 102 kDa, e l'altra di 99 kDa, con diversa distribuzione cellulare (36, 37). Nei mammiferi, la PARG contiene un dominio catalitico all'estremità C- terminale, uno regolatorio all'estremità N-terminale ed un segnale di localizzazione nucleare (NLS) ricco in leucine (**Figura 13**) (38).

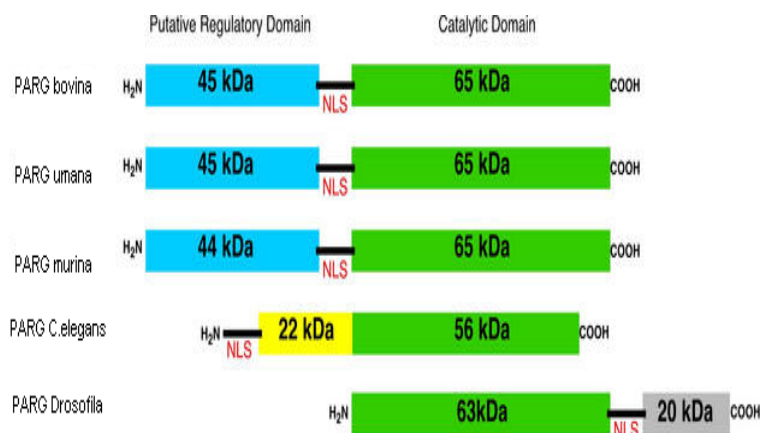


Figura 13 - Rappresentazione schematica della struttura molecolare dei domini delle tre isoforme dell'enzima PARG (41).

La PARG, isolata da estratti cellulari è spesso presente sottoforma di un frammento di circa 60kDa, prodotto dall'azione di proteasi su un sito specifico nella regione N-terminale. Tale frammento conserva intatto il sito catalitico nella regione C-terminale e sembra essere coinvolto nella regolazione della concentrazione citoplasmatica di poli-ADPR in

prossimità dei mitocondri e di modulare la risposta all'apoptosi (39). E' stato ipotizzato che il controllo dell'attività è regolata da un continuo "shuttling" nucleocitoplasmatico, evidenziato durante l'apoptosi, o in risposta a radiazioni che inducono danni al DNA o nelle diverse fasi del ciclo cellulare (40, 41).

Ohashi e coll. hanno riportato che la PARG si associa con il centrosoma durante l'anafase e la telofase e sedimenta con la frazione centrosomica nel corso di un frazionamento subcellulare (42).

Negli ultimi anni, l'interesse verso gli inibitori della PARG è notevolmente aumentato, grazie al loro possibile utilizzo farmacologico in diverse patologie.

Un nuovo approccio per la prevenzione della morte neuronale, dovuta alla massiva attivazione della PARP, consiste nell'inibizione della PARG. I più potenti inibitori della PARG, sono i tannini. Questi composti inibiscono la PARG mediante competizione con il PAR, per i siti di legame dell'enzima. In particolare sono conosciuti, ad oggi, due meccanismi mediante i quali gli inibitori della PARG potrebbero influenzare la morte cellulare PARP-mediata (34).

Il primo prevede un rallentamento del turnover del PAR limitando, quindi, la deplezione di NAD^+ ; l'altro previene la rimozione del PAR dalla PARP1. In questo modo, gli inibitori della PARG bloccherebbero indirettamente l'attività della PARP1, a causa dell'accumulo del poli-ADP ribosio (34).

Ying e collaboratori hanno dimostrato che, durante l'ischemia, una soppressione dell'attività PARG, chimica o genetica, produce due diverse conseguenze sulla poli-ADPribosilazione (34). L'inibizione della PARG mediata dalla gallotannina, suo potente inibitore, incrementa

l'auto-poli-ADPriboseilazione della PARP1, mentre quella genetica ne determina la soppressione (43-50).

Ulteriori studi, infine, hanno mostrato che gli inibitori della PARG riducono anche la morte neuronale indotta dal glutammato. Negli astrociti, in particolare, la gallotannina riduce di circa il 50% l' H_2O_2 , principale responsabile dell'induzione della morte cellulare astrocitaria (51).

Recentemente, è stato scoperto un potente inibitore della PARG, l'adenosina di fosfato-(idrossimetil)-pirrolidinediolo (ADP-HPD), un analogo dell'ADPR. L'ADP-HPD inibitore parzialmente non competitivo, presenta una IC_{50} di 0,33 μM . L'inibizione è prodotta dalla diretta interazione tra l'anello di adenina dell'ADP-HPD e la tirosina 795 (Y 795) della PARG umana, che è un residuo conservato in tutti gli organismi (52).

Sulla base di queste osservazioni e tenendo conto del ruolo svolto dalla PARG negli eucarioti superiori, è stato interessante valutare se anche nel cefalopode il turnover del poli-ADPribose fosse garantito da un analogo enzima in grado di svolgere le stesse funzioni.

Pertanto il lavoro è consistito nel :

- analizzare l' eventuale attività della PARG nelle frazioni citoplasmatiche provenienti dai distretti nervosi esaminati ;
- definire alcuni parametri cinetici dell'enzima, anche in presenza i un noto inibitore della PARG umana (ADP- HPD).

MATERIALI E METODI

1) Isolamento dei nuclei da testicolo di ratto

Per isolare i nuclei da testicolo di ratti è stato utilizzato il metodo di Adamietz e coll., apportando ad esso alcune modifiche, come riportato in Materiali & Metodi paragrafo 5a, SEZIONE I (32).

2) Preparazione della frazione citoplasmatica da cervello, lobi e nervi ottici

Il cervello, i lobi ed i nervi ottici dal peso, sono stati utilizzati per le esperienze riportate. I nuclei, dai diversi campioni, sono stati isolati utilizzando il metodo di Adamietz e coll., con alcune modifiche secondo quanto descritto in Materiali & Metodi, paragrafo 1, SEZIONE I (32).

La frazione citoplasmatica ottenuta dai tre distretti nervosi esaminati, sono state conservate a -20°C per le esperienze successive.

3) Determinazione della concentrazione proteica

La concentrazione proteica è stata determinata utilizzando una modifica commerciale (Pierce) del metodo di Bradford, come già descritto in Materiali & Metodi, paragrafo 2, SEZIONE I.

4) Isolamento ed analisi del poli-ADPribsio

Sospensioni nucleari di ratto e frazioni citoplasmatiche dei tre distretti nervosi di *Octopus vulgaris*, (Materiali & Metodi, paragrafo 5a, SEZIONE I, paragrafo 1 SEZIONE I), sono state utilizzate per la sintesi e l'isolamento del poli-ADP-ribosio secondo quanto descritto nel paragrafo 5b, SEZIONE I.

5) Determinazione dell'attività poli-ADPR glicoidrolasica

L'attività poli-ADPR glicoidrolasica è stata determinata mediante il metodo di Bernardi e coll., (53) modificato, e/o mediante filtrazione del materiale TCA insolubile ottenuto dopo incubazione con proteinasi K (0,2mg/ml). Un'aliquota della frazione citoplasmatica da cervello di *Octopus vulgaris* corrispondente ad 80 µg di proteine è stata incubata a 37°C per 15 min., in tampone Tris-HCl 100mM, pH 8,0, e DTT 10mM, in presenza del [³²P]-poli-ADPR (1500 cpm/nmole) del cefalopode in un volume finale di 60 µl. Al termine dell'incubazione, la reazione è stata interrotta a 60°C per 10min.

Successivamente, i campioni sono stati sottoposti a digestione con proteinasi K per 1h a 37°C. Infine il campione è stato concentrato ed analizzato secondo quanto descritto nel paragrafo 4.

Un'aliquota della frazione citoplasmatica da cervello è stata incubata con [³²P]-poli-ADPR da testicolo di ratto (8 pmoli) nelle stesse condizioni sopra descritte ed analizzata mediante cromatografia su strato sottile (TLC), su lastre di PEI- cellulosa in ammonio bicarbonato 0,05M. In tali condizioni di analisi, il poli-ADPR rimane alla semina, mentre l'ADPR e il NAD⁺ hanno mobilità più elevate e ben distinte tra loro. La rivelazione è stata eseguita mediante Personal Imager FX (Biorad) ed il programma Quantity One.

Alternativamente, la reazione con proteinasi K è stata interrotta mediante l'aggiunta di TCA 30% freddo. Il materiale TCA-precipitabile, così ottenuto, è stato lavato mediante filtrazione su carta Millipore del tipo HAWP00010 (0,45 µm), con 20-30 volumi di TCA 7% freddo. La radioattività associata al filtro è stata misurata in uno scintillatore in fase

liquida (Bechman LS 1701), in seguito all'aggiunta di 5ml di liquido di scintillazione.

L'attività enzimatica è stata espressa, in termini %, come decremento della radioattività incorporata nel materiale TCA precipitabile.

6) Determinazione dell'attività poli-ADPR glicoidrolasica a diverse concentrazioni di frazione citoplasmatica da cervello e di [^{32}P]-poli-ADPR

Differenti aliquote provenienti da frazioni citoplasmatiche da cervello di *Octopus vulgaris* (da 10 μg a 100 μg) sono state incubate con [^{32}P]-poli-ADPR (8 pmoli), purificato da nuclei da testicolo di ratto (Materiali & Metodi, paragrafo 5b SEZIONE I), mediante il metodo di Bernardi e coll. (Materiali & Metodi, paragrafo 5 di questa sezione).

Nelle stesse condizioni sperimentali è stata misurata l'attività PARG in frazioni citoplasmatiche da cervello (80 μg), in funzione di diverse concentrazioni del substrato [^{32}P]-poli-ADPR (da 60 a 600 pmoli).

7) Determinazione dell'attività poli-ADPR glicoidrolasica in frazioni citoplasmatiche da cervello, in presenza dell'inibitore ADP-HPD

Differenti concentrazioni di ADP-HPD (da $1,6 \times 10^{-4}\text{mM}$ a 5mM) sono state aggiunte alla frazione citoplasmatica da cervello del cefalopode (80 μg) nella miscela di incubazione per la determinazione dell'attività PARG, in presenza di [^{32}P]-poli-ADPR (160 pmoli) come descritto in Materiali & Metodi paragrafo 5.

L'effetto inibitorio dell'ADP-HPD sull'attività della PARG in tutte le frazioni è stato determinato sulla base della diminuzione di incorporazione

del materiale TCA-precipitabile, ottenuto dopo digestione con proteinasi K (0,2mg/ml).

Infine, il [^{32}P]-poli-ADPR (160 pmoli) è stato incubato con la frazione citoplasmatica (80 μg) da cervello nelle condizioni standard di saggio della PARG, in presenza ed assenza di ADP-HPD 5mM.

Successivamente, le miscele sono state sottoposte a TLC su lastre di PEI-cellulosa in ammonio bicarbonato 0,05M.

L'attività della PARG è stata calcolata, considerando pari al 100% la densità ottica corrispondente al polimero non incubato, e misurandone la riduzione percentuale dopo incubazione del poli-ADPR in presenza dei vari campioni.

RISULTATI

I. Determinazione dell'attività della PARG

a) Attività della PARG a diverse concentrazioni di frazione citoplasmatica da cervello di *Octopus vulgaris*

L'attività della poli-ADPRglicoidrolasi è stata analizzata visualizzando il prodotto della reazione, l'ADPR, in seguito alla separazione cromatografia su strato sottile TLC (Materiali & Metodi, paragrafo 5).

In **Figura 14** è mostrata la degradazione del poli-ADPR (8 pmoli) a diverse concentrazioni di frazione citoplasmatica da cervello.

L'analisi autoradiografica rivela che concentrazioni del campione pari a 10 e 20 µg di proteine non sono sufficienti a degradare quantità significative di polimero, come dimostra la presenza del segnale radioattivo corrispondente al poli-ADPR al punto di semina.

Raddoppiando la frazione citoplasmatica (40 µg di proteine), invece, si osserva un netto decremento del segnale radioattivo nel punto di carico (poli-ADPR), e la contemporanea comparsa di una banda radioattiva a maggiore mobilità che corrisponde all'ADPR. La completa degradazione del polimero appare evidente quando viene utilizzata una concentrazione di frazione citoplasmatica corrispondente ad 80 µg di proteine.

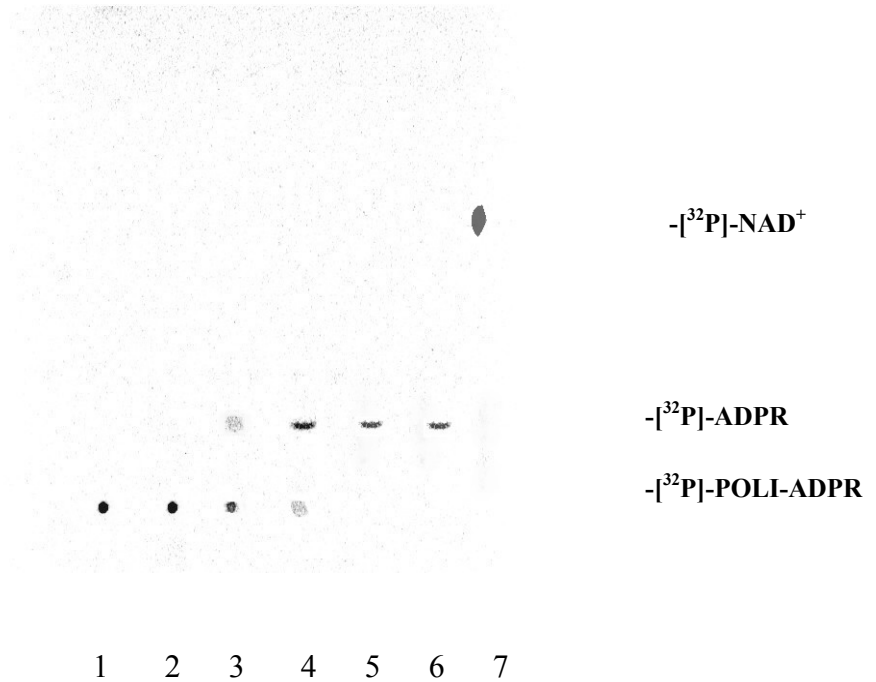


Figura 14- Autoradiografia dei prodotti della reazione catalizzata dalla PARG ($[^{32}\text{P}]$ -Poli-ADPR= 8 pmoli) in frazioni citoplasmatiche da cervello (FCC) di *Octopus vulgaris*, a diversa concentrazione
 1= $[^{32}\text{P}]$ -poli-ADPR ; 2= FCC 10 μg ; 3= FCC 20 μg
 4= FCC 40 μg ; 5= FCC 80 μg ; 6= FCC 100 μg ; 7= $[^{32}\text{P}]$ -NAD⁺

b)Attività della PARG a diverse concentrazioni di poli-ADPR

Sulla base di quanto osservato in precedenza, e, assumendo che 80 μg di proteine da frazione citoplasmatica di cervello presentino una quantità di PARG endogena in grado di degradare 8 pmoli di poli-ADPR, è stata presa in esame l'attività poli-ADPRglicoidrolasica variando la concentrazione di substrato e mantenendo invariata la concentrazione di enzima .

I risultati hanno indicato che basse concentrazioni di poli-ADPR (60 -240 pmoli) vengono completamente degradate ad ADPR, concentrazioni maggiori vengono digerite parzialmente (320 pmoli) o non degradate (600 pmoli) (**Figura 15**).

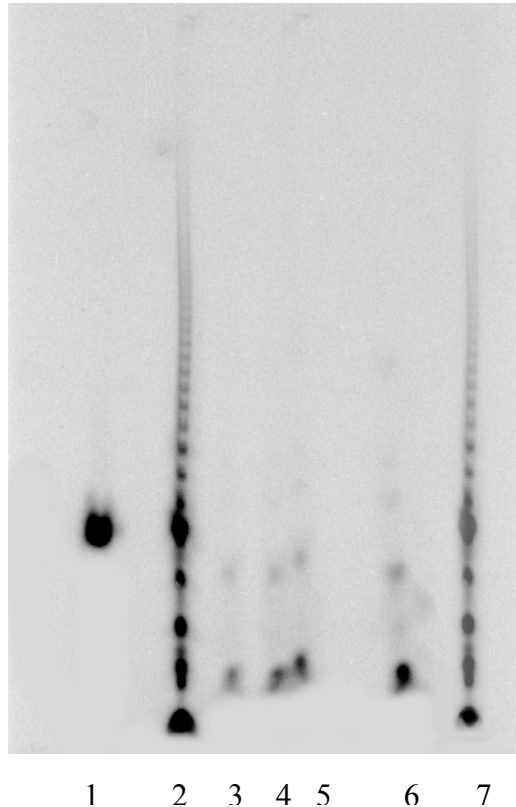


Figura 15 – Autoradiografia dell'attività PARG a diverse concentrazioni di substrato.

1= [^{32}P]-NAD $^{+}$; 2= [^{32}P]-Poli-ADPR da nuclei di testicolo di ratto (ntr) 1000 pmoli (in assenza di PARG)

3=[^{32}P]-Poli-ADPR (ntr) 60 pmoli; 4=[^{32}P]-Poli-ADPR (ntr) 120 pmoli

5=[^{32}P]-Poli-ADPR (ntr) 240 pmoli; 6=[^{32}P]-Poli-ADPR (ntr) 320 pmoli

7=[^{32}P]-Poli-ADPR (ntr) 600 pmoli

c) Attività della PARG in presenza ed assenza dell'inibitore ADP-HPD

E' stata studiata l'inibizione prodotta dall'ADP-HPD sull'attività dell'enzima in esame, in seguito ad incubazione della frazione citoplasmatica da cervello (80 µg di proteine) con poli-ADPR (160 pmoli), come indicato in Materiali & Metodi, paragrafo 7.

L'inibizione dell'attività poli-ADPRglicoidrolasica, espressa come % di polimero residuo risulta essere dose-dipendente, con un incremento proporzionale alle concentrazioni di inibitore. Il massimo effetto inibitorio è stato ottenuto in presenza dell'ADP-HPD 5mM in cui solo il 20% del poli-ADPR veniva degradato; inoltre, tale effetto restava inalterato anche all'aumentare della concentrazione dell'inibitore (**Figura 16**).

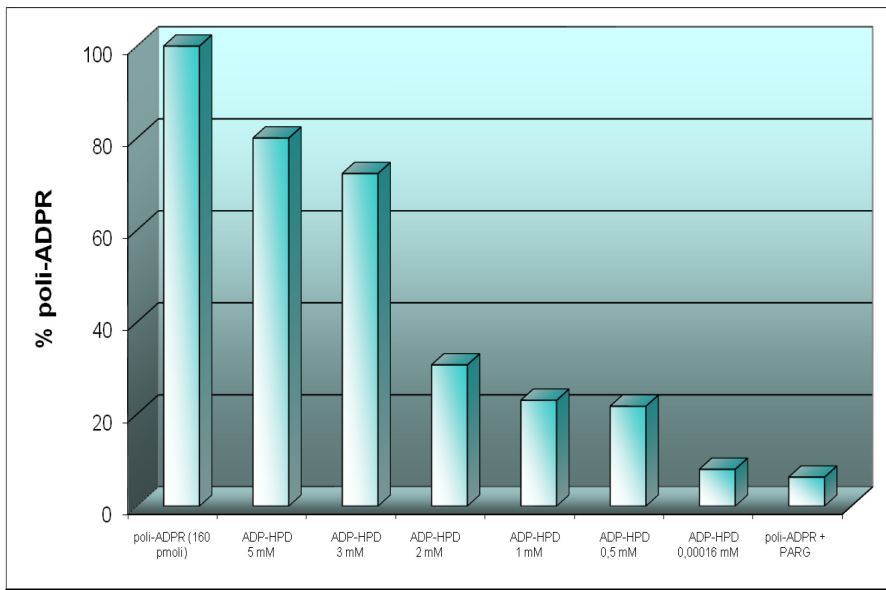


Figura 16 – Inibizione della PARG citoplasmatica (80 µg) da cervello di *Octopus vulgaris* in presenza di diverse concentrazioni dell'inibitore ADP-HPD, ed a concentrazione fissa di poli-ADPR (160 pmoli).

Una ulteriore conferma dei dati di attività enzimatica è stata ottenuta dall'analisi su TLC del poli-ADPR in presenza ed assenza di ADP-HPD 5mM. Le analisi densitometriche hanno evidenziato la completa degradazione del poli-ADPR in seguito al trattamento PARG, mentre in presenza dell'inibitore circa il 65% del polianione non è digerito (**Figura 17**).

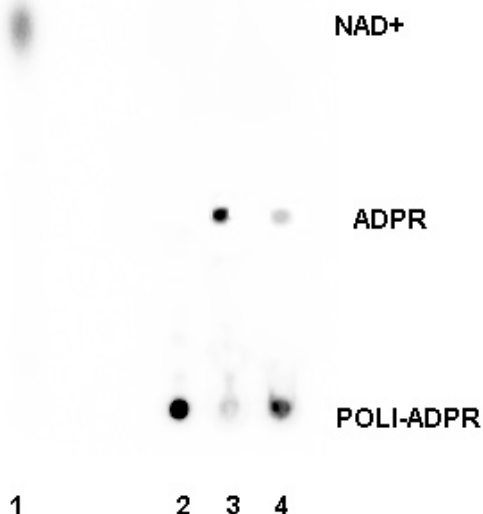


Figura 17 -Autoradiografia dei prodotti dell'attività PARG in presenza ed assenza dell'inibitore ADP-HPD (5mM) in frazioni citoplasmatiche da cervello di *Octopus vulgaris*.
 1= [32 P]-NAD $^{+}$; 2=[32 P]-Poli-ADPR (ntr);3=[32 P]-Poli-ADPR in assenza di ADP-HPD ; 4=[32 P]-Poli-ADPR in presenza di ADP-HPD.

DISCUSSIONE

Poiché è noto che la reazione di poli-ADPribosilazione è reversibile e che il rapido turnover del polimero è funzione dell'attività poli-ADPRglicoidrolasica, in questa parte del lavoro di tesi, si è indagato sull'eventuale presenza dell'enzima PARG in frazioni citoplasmatiche provenienti dal cervello di *Octopus vulgaris*.

Nella prima fase della ricerca si è proceduto all'isolamento dei polimeri di ADPR da testicolo di ratto e da cervello di *Octopus vulgaris*, che sono stati successivamente utilizzati, in tutte le esperienze riportate, come substrato dell'enzima in esame (**Figura 10**).

L'esistenza della PARG nel cervello del polpo, è stata dimostrata indirettamente, evidenziando che il prodotto di degradazione del polimero è l'ADPR, e che la digestione è funzione della quantità sia di proteine che di substrato utilizzati (**Figura 14-15**).

La conferma dell'esistenza di una PARG endogena nel sistema nervoso centrale di *Octopus vulgaris* è stato ottenuta verificando l'effetto dell'ADP-HPD, noto inibitore della PARG umana, il quale produce anche nel cefalopode una forte inibizione (circa l'80%), ma a concentrazioni significativamente più elevate (5mM) di quelle note per inattivare la glicoidrolasi umana (**Figura 16-17**).

Ad oggi, è noto che la degradazione del poli-ADPR a livello nucleare, bloccando l'inattivazione della PARP-1 evita, gravi danni cellulari.

Recentemente, inoltre, è stato dimostrato che, grazie all'azione concertata della PARG e dell'ADPribosio pirofosforilasi (ARPP), il mono-ADPR liberato a livello nucleare, viene convertito ad ATP, che potrebbe costituire

una riserva energetica, utilizzabile dagli enzimi coinvolti nella riparazione del DNA.

Poiché, invece, non è stato ancora chiarito del tutto il ruolo fisiologico delle PARG citoplasmatiche, il sistema nervoso di *Octopus vulgaris* potrà rappresentare il modello di studio ideale per definire il ruolo fisiologico svolto sia dall'enzima di sintesi che di degradazione del poli-ADPR.

CAPITOLO III

Analisi degli accettori di poli-ADPR

Mentre è noto che il sistema di poli-ADPribosilazione ha un ruolo importante nel mantenimento dell'integrità genomica (riparazione del DNA, amplificazione genica, apoptosi) e nella regolazione di funzioni cellulari correlate alla espressione e propagazione dell'informazione genetica (trascrizione e replicazione del DNA, differenziamento cellulare, trasformazione neoplastica) (8, 54), molto poco si sa del ruolo della reazione catalizzata dalla v-PARP.

L'interesse dei ricercatori si è focalizzato sullo studio delle proteine accettrici del poli-ADPribosio sintetizzato dall'enzima di 193 kDa. Questo prodotto differisce da quello più complesso della PARP 1, in quanto non presenta ramificazioni e raggiunge una lunghezza massima di 20-30 residui di ADP-ribosio. Tuttavia, come polianione, è anch'esso in grado di legarsi a proteine bersaglio alterandone le proprietà fisiche e biochimiche, e regolando, in alcuni casi, le interazioni proteina- proteina. La stessa v-PARP va incontro ad automodificazione (20).

A livello citoplasmatico, la v-PARP si trova incorporata nelle particelle ribonucleoproteiche o associata in strutture allungate simili a bastoncelli denominate "v-PARP rods" (55).

Van Zon e coll., hanno dimostrato che la v-PARP nelle vaults conserva la sua attività ADPribosilante e che la major vault protein (MVP) rappresenta il suo accettore preferenziale (55). In particolare, quando i livelli di MVP sono elevati, si osserva una maggiore quantità del complesso ribonucleoproteico, in cui la p-193 risulta incorporata. A 21°C, questi complessi interagiscono tra loro costituendo strutture altamente ordinate

definite “i tubi delle vaults”, che si originano in seguito all’interazione tra l’MVP di un complesso RNP e la stessa proteina di un complesso adiacente. Pertanto, in queste condizioni sperimentali, quasi tutta la p-193 è associata ai tubi e non è disponibile per la formazione delle “v-PARP rods” (56,57). Entrambi i processi sono reversibili a 37°C, pertanto, l’aumento di temperatura determina il rilascio nel citosol dell’enzima da entrambe le strutture. La stabilità dei “tubi delle vaults” è influenzata oltre che dalla temperatura, anche dalla stabilità dei microtubuli. Infatti, sia la depolimerizzazione dei microtubuli ad opera del nocodazolo, sia la loro stabilizzazione in seguito a trattamento con taxolo non è in grado di indurre la formazione dei tubi a 37°C. Al contrario, a 21°C l’incubazione delle cellule con il taxolo favorisce la loro formazione (55).

Eichenmüller e coll., hanno dimostrato che le vaults sono in grado di associarsi ai microtubuli attraverso un dominio NTPasico della TEP1 simile al dominio ATPasico di proteine motrici come la dineina. Queste interazioni potrebbero essere necessarie per il trasporto delle particelle RNP anche a distanze significative, dato che esibiscono movimenti anterogradi e retrogradi con trasporto assonale veloce sia in neuriti di cellule PC12 che in cellule di ovario da criceto (28, 58-60). Nella maggior parte dei casi, le vaults si dispongono con il loro asse perpendicolarmente ai microtubuli, raramente si legano ad essi attraverso il barile centrale. Il legame ai microtubuli è unico, in quanto pare che induca un cambiamento conformazionale nel complesso, sufficiente a prevenire il legame al “cap” opposto (28). La microscopia confocale ha dimostrato che il movimento delle particelle ribonucleoproteiche può essere determinato anche da un motore molecolare come l’actina, componente fondamentale

nell'architettura citoscheletrica, coinvolta in numerosi processi cellulari, quali la fagocitosi, la locomozione cellulare, grazie alla sua capacità di passare da una forma filamentosa ad una monomerica (58).

Infine, analisi biochimiche ed immunofluorescenti hanno evidenziato che la p-193 non è tutta associata alle vaults, ma che una piccola parte è localizzata nel nucleo o a livello del fuso mitotico. Ad oggi, non è ancora noto se l'enzima associato al fuso mitotico è attivo enzimaticamente e quale sia la sua funzione.

Sulla base di queste osservazioni, è evidente che la v-PARP può interagire fisicamente con altre proteine cellulari e, poiché, nel sistema nervoso del cefalopode l'enzima costituisce uno dei componenti del complesso di 240kDa, accettore di poli-ADPR, questa parte del lavoro è consistita nel:

- identificare le diverse componenti presenti nel complesso proteico di 240kDa, e studiare le interazioni che si stabiliscono tra loro.
- dissociare il complesso;
- evidenziare l'eventuale presenza di accettori non covalenti di poli-ADPribose nel sistema in esame.

MATERIALI E METODI

1) Preparazione della frazione citoplasmatica da cervello, lobi e nervi ottici.

Sono stati utilizzati per le esperienze riportate il cervello, i lobi ed i nervi ottici. I nuclei, dai diversi campioni, sono stati isolati utilizzando il metodo di Adamietz e coll., con alcune modifiche secondo quanto descritto in *Materiali & Metodi*, paragrafo 1, SEZIONE I (32).

La frazione citoplasmatica ottenuta dai tre distretti nervosi esaminati, è stata conservata a -20°C per le esperienze successive.

2) Determinazione della concentrazione proteica

La concentrazione proteica è stata determinata utilizzando una modifica commerciale (Pierce) del metodo di Bradford, come già descritto in *Materiali & Metodi*, paragrafo 2, SEZIONE I.

3) Analisi elettroforetica di proteine accettrici di ADPR su gel di poliacrilammide in SDS

Le analisi elettroforetiche degli omogenati e delle frazioni citoplasmatiche ottenute da cervello, lobi e nervi ottici (20 µg di proteine) sono state effettuate su gel di poliacrilammide (al 7% o al 10%) come descritto in *Materiali & Metodi* paragrafo 4a, SEZIONE I.

4) Western blotting

L'analisi elettroforetica delle frazioni è stata effettuata caricando le proteine in duplicato. Dopo corsa elettroforetica, una parte del gel è stato colorato con Coomassie Brilliant Blue R, mentre le proteine non colorate

sono state trasferite su un foglio di nitrocellulosa secondo quanto descritto in **Materiali & Metodi** paragrafo 4b, SEZIONE I.

Il filtro è stato incubato con anticorpi anti-actina e anti-poli-ADPR diluiti (1:1000 v/v) per 2h a temperatura ambiente, utilizzando per la rivelazione anticorpi secondari anti-rabbit (1:2000 v/v) coniugati con perossidasi per 1h a temperatura ambiente

5) Isolamento e disgregazione del complesso

a) Cromatografia per gel filtrazione su colonna di Sephacryl S-100

Una aliquota di frazione citoplasmatica da cervello (1,29 mg totali) è stata caricata su colonna di sephacryl S-100 (0,5 x 7 cm), equilibrata in Tris/HCL 10mM, ed eluita in tampone Tris/HCL 10mM, pH 8,0. Le frazioni eluite (100µl) sono state sottoposte ad immunoblotting per identificare quelle in cui è stato eluito il complesso a 240kDa.

b) Degradazione del poli-ADPR legato all'accettore di 240 kDa

Una aliquota di frazione citoplasmatica di cervello (40µg) è stata incubata con incubata con [³²P]-NAD 0,41 mM (40000 cpm /nmole), in presenza di Tris-HCl 0,5 M, pH 8,0 , MgCl₂ 50 mM e DTT 10 mM, per 10minuti a temperatura ambiente e sottoposto ad analisi elettroforetica in SDS. Successivamente la banda corrispondente al complesso è stata recisa dal gel ed incubata in presenza della frazione citoplasmatica di cervello (80 µg), nelle condizioni di saggio standard per la poli-ADPR glicoidrolasi (**Materiali & Metodi**, paragrafo 5, SEZIONE II).

In seguito all'incubazione, il prodotto della reazione ottenuto nella fase acquosa mediante estrazione con cloroformio /alcool isoamilico (24:1, v/v),

è stato analizzato mediante cromatografia su strato sottile su lastre di PEI-cellulosa in ammonio bicarbonato 0,05 M.

L'esposizione e l'analisi delle immagini sono state effettuate utilizzando il Personal Imager FX (Biorad) e il programma Quantity One.

c) Disgregazione del complesso purificato

Il complesso di 240kDa (2 µg) è stato incubato a temperatura ambiente per 1h in presenza di NaCl 1 M, e, successivamente, sottoposto ad analisi elettroforetica in condizioni denaturanti, seguita da immunoblotting, per mettere in evidenza la disgregazione del complesso e identificarne le componenti.

6) Poli-ADPR Blot

L'identificazione di proteine che legano non covalentemente il poli-ADPR è stata effettuata mediante poli-ADPR blot (62).

Aliquote di frazione citoplasmatica di cervello (20 µg) sono state caricate in duplicato su minigel di poliacrilammide (5x7 cm) in SDS, e, dopo separazione elettroforetica, le proteine sono state sia colorate con blu di Coomassie che trasferite su filtro di nitrocellulosa. Il filtro di nitrocellulosa è stato sottoposto a ripetuti lavaggi con tampone TBS- tween 0,05%, e successivamente incubato con poli-ADPR non marcato sintetizzato e purificato in vitro secondo la metodica descritta da Panzeter e Althaus (63).

Al termine dell'incubazione (24 h a temperatura ambiente), la membrana di nitrocellulosa è stata sottoposta ad immunorivelazione con anticorpi policlonali anti-poli-ADPR come descritto nel paragrafo 4 di questa sezione.

RISULTATI

I. Immunoblotting della frazione citoplasmatica da cervello incubata nelle condizioni di saggio PARG con anticorpi anti-v-PARP, anti- poli-ADPR ed anti-actina

Poiché è noto che la v-PARP è in grado di automodificarsi, è stato ipotizzato che quest'ultima potesse legare l'altra componente del complesso proteico, non ancora identificata, tramite un ponte di poli-ADPR.

Per verificare la veridicità di tale ipotesi, la frazione citoplasmatica di cervello è stata incubata nelle condizioni di saggio standard per l'enzima PARG, allo scopo di digerire il polimero "linker" delle componenti del complesso.

L'analisi elettroforetica delle proteine del campione sottoposto a tale trattamento e il successivo immunoblotting con anticorpi anti-v-PARP hanno mostrato la scomparsa delle bande a 193 kDa e a 240kDa, e la contemporanea comparsa di segnali immunopositivi, a più alto peso molecolare (**Figura 18 A –B**).

Il netto segnale di immunopositività a 240kDa, evidenziato in presenza di anticorpi anti-PAR, ha confermato l'esistenza di un ponte di poli-ADPR tra le componenti del complesso proteico (**Figura 18-C**).

Nelle stesse condizioni sperimentali, si osserva, inoltre, un secondo segnale di immunopositività, molto intenso a circa 70kDa, mai evidenziato per radioattività.

Infine, l'immunoblotting delle stesse frazioni con anticorpi anti-actina, utilizzati per evidenziare l'actina come standard interno, ha indicato che in tale frazione, oltre al segnale corrispondente all'actina libera (circa 50kDa), sono presenti altri due segnali immunopositivi, di cui uno corrispondente al

peso molecolare dell'accettore di ADPR (240kDa) e l'altro colocalizzato con la banda a 70kDa, evidenziata con gli anticorpi anti-poli-ADPR

(**Figura 18-D**).

Nel campione sottoposto al trattamento per l'attività della PARG, è evidente lo "shift" dei segnali immunoreattivi (48kDa e 70kDa) verso il punto di carico del gel.

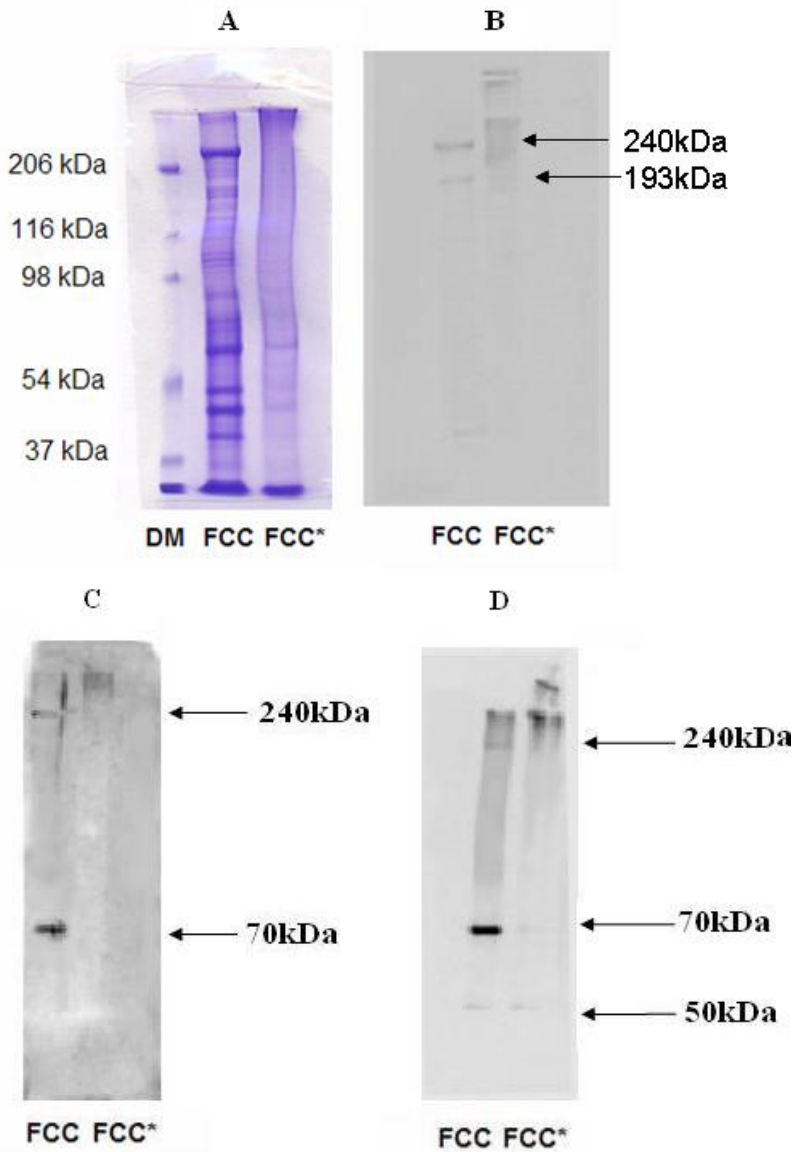


Figura 18 -SDS- PAGE (A) ed immunorivelazione con anticorpi anti- v-PARP delle proteine (20 µg) (B); con anticorpi anti- poli- ADPR (C); con anticorpi anti-actina da frazioni citoplasmatiche di cervello (D). DM = Dalton Markers ; FCC= Frazione citoplasmatica di cervello FCC*= Frazione citoplasmatica di cervello in condizioni di saggio per la PARG.

II. Isolamento e disgregazione del complesso

a) Purificazione del complesso di 240kDa

L'analisi elettroforetica delle frazioni eluite dalla colonna di Sephacryl S-100 e la successiva immunorivelazione con specifici anticorpi anti v-PARP ed anti-actina hanno indicato che il complesso di 240kDa viene fluito, come atteso, nel volume di esclusione (V_0) (**Figura 19**).

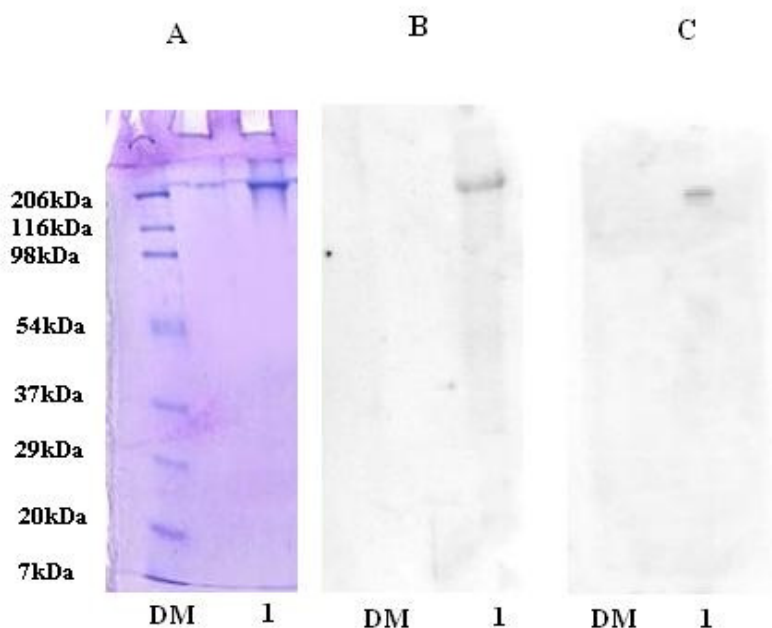


Figura 19-SDS-PAGE 12% (A), immunorivelazione con anticorpi anti-v-PARP (B), immunorivelazione con anticorpi anti-actina (C). DM= Dalton Markers ; 1= complesso purificato (240kDa).

b) Degradazione del poli-ADPR legato all'accettore di 240 kDa

Allo scopo di ottenere un' ulteriore conferma dell'esistenza di un ponte di poli-ADPR tra la v-PARP e l'actina, il complesso di 240kDa è stato incubato nelle condizioni di saggio della PARG in presenza della frazione citoplasmatica da cervello (80 µg).

L'analisi autoradiografica del prodotto di degradazione ottenuto mediante estrazioni con cloroformio/alcool isoamilico e sottoposto a TLC, ha evidenziato un unico segnale corrispondente alla migrazione dell'ADPR standard (**Figura 20**).

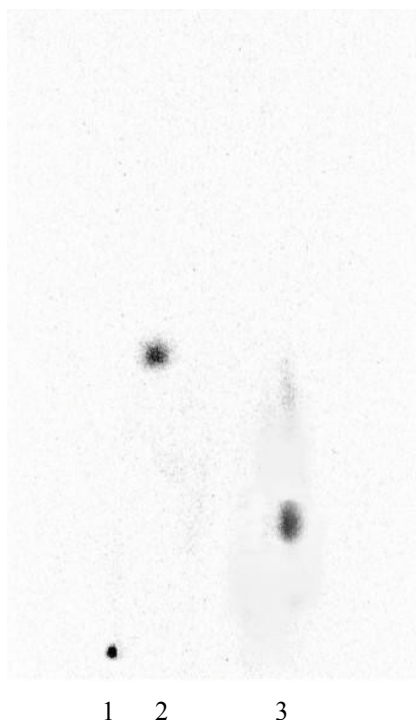


Figura 20 -Autoradiografia della TLC dopo analisi, dell'accettore proteico di 240kDa sottoposto a trattamento nelle condizioni di saggio della PARG.

1= [32 P]- poli-ADPR ; 2= [32 P] -NAD;

3= prodotto di degradazione del polimero legato all'accettore di 240kDa.

c) Disgregazione del complesso purificato di 240kDa ed immunorivelazione dei componenti del complesso disgregato

L'analisi elettroforetica del complesso proteico purificato dopo trattamento con NaCl 1M per 1 h a temperatura ambiente, ha mostrato la presenza di due bande aventi rispettivamente un peso molecolare di 193kDa e di 50kDa.

Il successivo immunoblotting delle stesse frazioni utilizzando anticorpi anti-v-PARP ed anti-actina, ha confermato, ancora una volta, che le componenti del complesso di 240kDa sono l'enzima v-PARP e l'actina monomerica (forma G) (**Figura 21**).

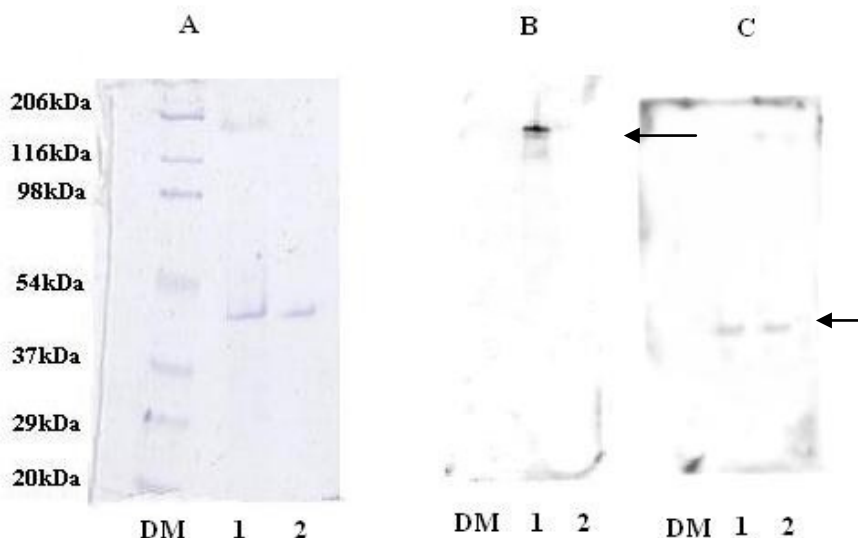


Figura 21 - SDS-PAGE 12% (A), immunorivelazione con anticorpi anti-v-PARP(B), (C) immunorivelazione con anticorpi anti-actina.
DM= Dalton Markers ; 1= v-PARP e actina; 2= actina commerciale
Le frecce indicano gli immunosegnali.

III. Poli-ADPR Blot

Mediante la tecnica del poli-ADPR blot (Materiali & Metodi, paragrafo 6), è stata presa in esame la capacità di proteine da frazione citoplasmatica di cervello di stabilire interazioni non covalenti con il poli-ADPribose.

E' importante sottolineare, infatti, che questa tecnica permette di evidenziare gli accettori proteici che legano non covalentemente il poli-ADPR, per la presenza di una sequenza consenso caratteristica (64).

In **Figura 22** è mostrato il risultato dell'analisi mediante poli-ADPR blot con il corrispondente profilo elettroforetico.

Il riconoscimento del complesso poli-ADPR/proteina, messo in evidenza con anticorpi anti-PAR, è alquanto selettivo, considerato il notevole numero di componenti proteiche presenti nel corrispondente profilo elettroforetico. Inoltre, il riconoscimento è anche specifico poiché le proteine di peso molecolare noto (DM) non mostrano segnali di immunopositività.

L'immunorivelazione mostra che l'unico accettore non covalente di poli-ADPR è l'actina, come evidenziato dal segnale di immunopositività a 50kDa corrispondente alla forma monomerica della proteina. Gli altri due segnali (in corrispondenza del complesso v-PARP-actina di 240kDa e dell'actina poli-ADP-ribosilata di 70kDa), rappresentano, come già riferito in precedenza, gli accettori covalenti endogeni del sistema in esame.

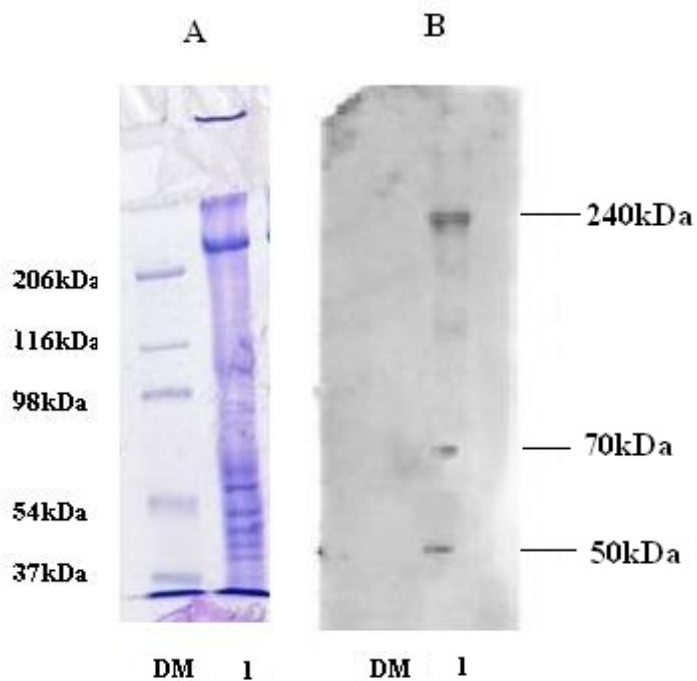


Figura 22 - SDS-PAGE 7 % (A), immunorivelazione con anticorpi anti-poli-ADPR (B).
DM= Dalton Markers; 1= Frazione citoplasmatica da cervello.

DISCUSSIONE

L'esistenza di un segnale immunopositivo a 240kDa evidenziato in seguito ad analisi dell'espressione proteica con anticorpi anti-v-PARP, suggerisce che l'unico accettore proteico di ADPR, è un complesso, di cui la v-PARP rappresenta uno dei componenti (**Figura 18-B**).

Al fine di dissociare le componenti del complesso, la frazione citoplasmatica da cervello dopo incubazione nelle condizioni di saggio standard per l'enzima PARG è stata sottoposta ad immunoblotting con anticorpi anti v-PARP.

La scomparsa dei segnali a 193kDa e a 240 kDa e la contemporanea comparsa di bande immunoreattive a più alto peso molecolare, fanno ipotizzare la formazione di aggregati proteici di dimensioni maggiori rispetto al complesso, in cui, la v-PARP sembra rimanere imbrigliata (**Figura 18-B**).

L'immunoblotting degli stessi campioni con anticorpi anti-PAR, che come è noto, riconoscono polimeri di lunghezza superiore a 5 unità di ADPR (**Figura 18-C**), ha fornito un importante chiarimento riguardo al tipo di interazione che stabilizza il complesso stesso. La presenza di un forte segnale di immunopositività a 240 kDa, dimostra infatti, l'esistenza di un ponte di poli-ADPR che tiene unite le componenti del accettore proteico (**Figura 18-C**).

Particolarmente interessante è stato l'aver evidenziato, in seguito allo "stripping" dello stesso filtro ed incubazione con anticorpi anti- actina, la presenza di un nuovo accettore di poli-ADPR del peso molecolare di circa 70 kDa, che è risultato essere l'actina modificata con poli-ADPR (**Figura 18-D**). La ritardata migrazione della proteina è correlata alla presenza di

30-35 unità di ADPR, che giustifica l'incremento del PM da 50 kDa (proteina nativa) a 70kDa (actina poli-ADPribosilata).

Questi risultati acquistano una grande rivelanza per il fatto che nel sistema in esame, gli anticorpi hanno evidenziato modificata endogenamente la proteina accettrice senza l'induzione della reazione per incubazione con NAD esogeno.

Un'ulteriore conferma riguardo alle due componenti proteiche del complesso, è stata ottenuta dopo isolamento e disaggregazione dello stesso, mediante trattamento in alto sale (**Figura 19-21**).

L'identificazione dell'ADPR, quale prodotto di degradazione dell'enzima PARG, ha dimostrato ancora una volta, che, il poli-ADPR è coinvolto nel legame tra la v-PARP e l'actina (**Figura 20**).

Infine, utilizzando la tecnica del poli-ADPR blot è stato individuato un unico accettore non covalente di PAR rappresentato dall'actina in forma monomerica

(~ 50kDa) (**Figura 22**).Questo risultato suggerisce che l'actina possiede la sequenza consenso di riconoscimento del PAR, descritta per altre proteine (64).

CAPITOLO IV

Modulazione dell'attività poli-ADPriboilante nel SNC di *Octopus vulgaris* da parte dell'ATP

L'actina esiste sotto forma di monomero globulare (forma G) (**Figura 23-A**) che di norma si lega ad una molecola di ATP. In condizioni fisiologiche, l'actina G polimerizza formando fibre a doppia elica (forma F) (**Figura 23-B**) (65).

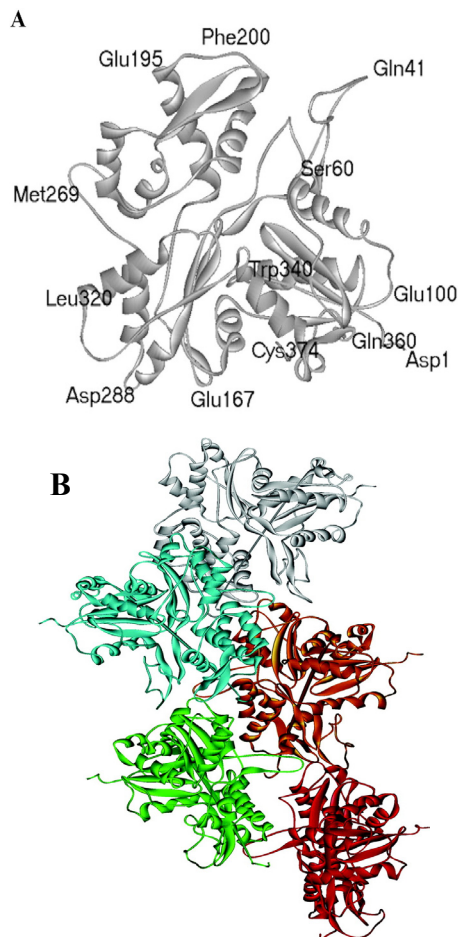


Figura 23 –Actina monomerica (forma G) (A); Actina filamentosa (forma F) (B).

Questa proteina, di cui sono note tre isoforme (α, β, γ), rappresenta una delle più importanti componenti della struttura citoscheletrica ed è coinvolta in processi cellulari come la fagocitosi. Negli eucarioti è essenziale per l'eliminazione di patogeni, per la locomozione ed il mantenimento della forma cellulare (66).

La sua struttura a raggi X mostra un sito di legame per il Ca^{+2} , uno per l'ADP e/o per un analogo non idrolizzabile dell'ATP (adenosina-5'- β, γ -immido) trifosfato. L'assemblaggio di più molecole di actina richiede energia fornita dall'idrolisi dell'ATP (67).

Un possibile modello di regolazione è basato sulle proprietà basiche dell'actina o sulla sua capacità di legare cationi bivalenti che ne modificano la conformazione, e sull'idrolisi dell'ATP (68). Nelle cellule deputate al movimento, un "pool" di actina è mantenuto non polimerizzato in seguito alla interazione della G-actina con altre proteine come timosina β_4 e profilino (69, 70). In seguito a stimolazione cellulare si verifica un aumento della F-actina, formata dalle interazioni non-covalenti tra molecole di G-actina monomerica rilasciate dal pool. Durante il processo di polimerizzazione l'ATP che è legato alla G-actina, è idrolizzato ad ADP che rimane legato alla F-actina. La reazione di idrolisi si compone di due fasi: la prima prevede l'idrolisi dell'ATP, quindi il rilascio di fosfato inorganico (71).

Durante la polimerizzazione due molecole di actina si associano debolmente tra loro e solo l'aggiunta di una terza porta alla formazione di un trimero più stabile, che diventerà il nucleo di polimerizzazione (71, 72). Il numero di monomeri che si aggiungono al nucleo di polimerizzazione è direttamente proporzionale alla concentrazione delle subunità libere, e la velocità di

polimerizzazione dipende da una costante K_{on} definita come la velocità con la quale si staccano le subunità dai terminali del polimero, mentre non dipende dalla concentrazione delle subunità.

L'allungamento del polimero provoca una riduzione della concentrazione delle subunità libere che porta al raggiungimento di una concentrazione critica dove la velocità di aggiunta e quella di distacco sono uguali. Le due estremità dei filamenti di actina polimerizzano con un ritmo differente: l'estremità con crescita veloce è definita positiva, mentre, quella a minore velocità è definita negativa, ciò è spiegabile in quanto si verifica un cambiamento conformazionale di ogni subunità che si aggiunge al polimero. Ogni molecola di actina è legata ad una di ATP che viene idrolizzato ad ADP in seguito all'assemblaggio nel polimero. L'idrolisi del nucleotide riduce la sua affinità di legame per le subunità adiacenti e ciò favorisce la dissociazione da ogni estremità del filamento (73).

L'ADPribosilazione sembra giocare un ruolo importante nell'equilibrio G-F actina partecipando in tal modo alla regolazione della riorganizzazione citoscheletrica (74).

Terashima e coll., hanno dimostrato che sia l'actina globulare che filamentosa sono ADPribosilate da una ADPribosil-trasferasi arginina-specifica di pollo. In seguito a tale modificazione la G-actina perde la sua capacità di polimerizzazione, mentre per la F-actina va incontro a depolimerizzazione (75).

Alla luce di queste conoscenze e considerando che l'actina nel sistema sperimentale in esame costituisce un accettore covalente di ADPR (nel complesso e non covalente in forma monomerica) ci siamo proposti di :

- verificare se l'ATP influenzi l'attività della v-PARP;

- studiare l'eventuale correlazione tra la poli-ADPriboseilazione dell'actina e gli stadi di polimerizzazione della proteina

MATERIALI E METODI

1) Determinazione dell'attività ADP-ribosilante in presenza ed assenza di ATP

L'attività ADPribosilante è stata condotta preincubando la frazione in esame (20 µg), in presenza di ATP a diverse concentrazioni per 1h ed incubata successivamente con [³²P]-NAD 0,41mM (10.000 cpm/nmole), nelle condizioni standard di saggio (Materiali & Metodi, paragrafo 3, SEZIONE I) (30).

2) Determinazione dell'attività ADP-ribosilante in presenza di actina e di ATP

L'attività ADPribosilante, nella frazione citoplasmatica di cervello di *Octopus vulgaris*, è stata determinata secondo quanto descritto Materiali & Metodi, paragrafo 3, SEZIONE I, anche in presenza ed assenza di actina esogena a diverse concentrazioni (0,01- 0,1 µg) e di ATP 50mM.

3) Analisi elettroforetica ed espressione dell'actina su gel di poliacrilammide in SDS della frazione citoplasmatica da cervello

Prima dell'analisi elettroforetica le proteine delle frazioni citoplasmatiche sono state incubate in presenza ed assenza di ATP (10 e 50mM) per 1 h in una miscela di saggio priva del [³²P]-NAD. Le stesse frazioni sono state incubate nelle condizioni di saggio per la PARG. L'actina commerciale (5µg) utilizzata come riferimento è stata sottoposta ad analoghi trattamenti.

I campioni concentrati sono stati caricati su gel di poliacrilammide (7%) in un sistema tampone Tris-glicina/SDS, come descritto in Materiali & Metodi, paragrafo 4a, SEZIONE I. Dopo la separazione elettroforetica i campioni sono stati trasferiti su filtro di nitrocellulosa, mediante elettoblotting, e incubati con anticorpi anti-actina (1:1000 v/v) secondo la metodica descritta in Materiali & Metodi, paragrafo 4b, SEZIONE I.

RISULTATI

I. Determinazione dell'attività ADP-ribosilante in presenza ed assenza di ATP

E' stata saggiata l'attività ADPribosilante in frazioni citoplasmatiche da cervello di *Octopus vulgaris* in assenza ed in presenza di diverse concentrazioni di ATP

(0,5-50 mM), in condizioni standard di saggio (Materiali & Metodi, paragrafo 1, di questa sezione).

I risultati mostrati in **Figura 24**, indicano una progressiva diminuzione dell'attività enzimatica all'aumentare della concentrazione di ATP, con una massimo di inibizione dell'81% preincubando per 1h il campione con 50mM di ATP.

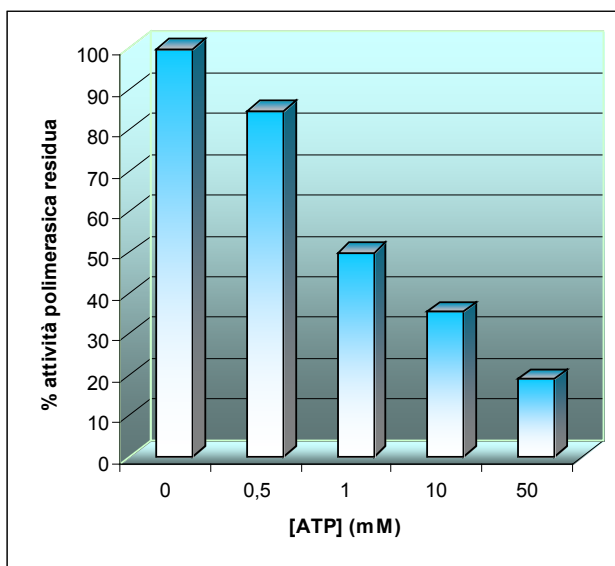


Figura 24 - Attività enzimatica in frazioni citoplasmatiche da cervello in presenza ed assenza di ATP a diverse concentrazioni.

II. Determinazione dell'attività ADP-ribosilante in presenza ed assenza di actina e di ATP

E' stata saggiata l'attività ADPribosilante in frazioni citoplasmatiche da cervello di *Octopus vulgaris* in assenza ed in presenza di actina commerciale a diverse concentrazioni e in presenza di ATP nelle condizioni standard di saggio.

L'attività enzimatica espressa come mU/g tessuto, mostrata in **Figura 25**, indica un progressivo aumento della stessa all'aumentare della concentrazione di actina, con un massimo di attività dopo aggiunta dell'accettore in quantità di 0,06 μg e che si mantiene costante a concentrazioni maggiori.

E' evidente che l'attività enzimatica tende al controllo, in seguito all'aggiunta sia dell' actina (0,06 μg) che di ATP 50mM .

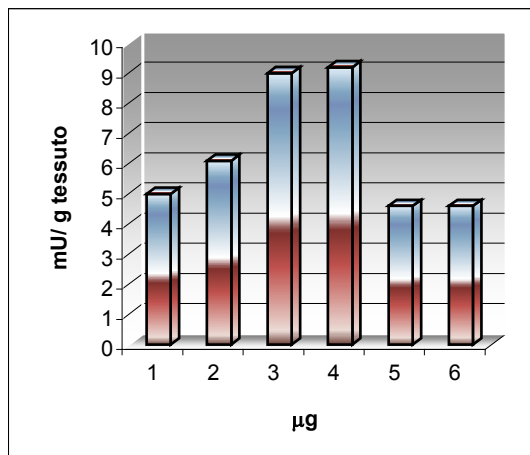


Figura 25 – Determinazione dell'attività enzimatica (PARP) in frazioni citoplasmatiche di cervello con e senza actina ed ATP.

1= Frazione citoplasmatica; 2 - 4= come 1+ actina 0,01, 0,03, 0,06 μg rispettivamente; 5 = come 4 + ATP 50mM rispettivamente
6 = come 1 + actina 0,1 μg , ATP 50 mM rispettivamente.

III. Immunorivelazione con anticorpi anti-actina in frazioni citoplasmatiche con e senza

ATP

In **Figura 26**, sono riportati i risultati riguardanti l'analisi elettroforetica di frazioni citoplasmatiche incubate in presenza e assenza di ATP. Le stesse frazioni sono state alternativamente sottoposte anche a trattamento nelle condizioni di attività della PARG. L'immunorivelazione delle frazioni incubate, in assenza ed in presenza di ATP 10 mM ha mostrato la presenza dei tre segnali a 240, 70 e 50 kDa, già evidenziati nelle esperienze precedenti.

Si osserva la comparsa di una forte immunopositività alla semina del gel, nei campioni incubati con ATP 50mM e sottoposti a saggio per la PARG.

L'actina commerciale, utilizzata come riferimento, polimerizza solo in seguito all'aggiunta di ATP 50mM.

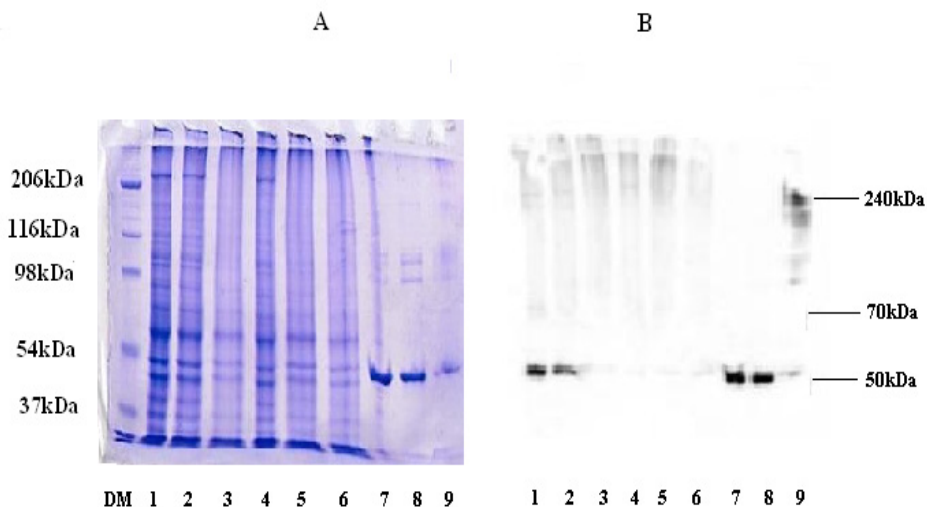


Figura 26 - SDS-PAGE 7% (A) ed immunorivelazione con anticorpi anti-actina (B).

DM= Dalton Markers

1= Frazione citoplasmatica cervello

2= Frazione citoplasmatica cervello + ATP 10m

3= Frazione citoplasmatica cervello + ATP 50mM

4= Frazione citoplasmatica cervello + trattamento PARG

5= Frazione citoplasmatica cervello + ATP 10mM + PARG

6= Frazione citoplasmatica cervello + ATP 50mM + PARG

7= Actina commerciale

8= Actina commerciale + ATP 10mM

9= Actina commerciale + ATP 50mM

DISCUSSIONE

E' stato ampiamente dimostrato che la poli-ADPriboseilazione svolge un ruolo fondamentale nella polimerizzazione e depolimerizzazione dell'actina. E' noto, inoltre, che il processo di polimerizzazione richiede l'idrolisi dell'ATP.

Lo studio della correlazione tra polimerizzazione dell'actina endogena ATP-dipendente e poli-ADPriboseilazione, ha indicato che l'aggiunta di quantità crescenti di ATP alla frazione citoplasmatica di cervello favorisce la polimerizzazione dell'actina, che sottrae l'eteroaccettore endogeno all'attività della v-PARP che risulta, infatti, diminuita (**Figura 24**).

L'aggiunta di piccole quantità di actina esogena nella miscela di saggio, induce un incremento dei livelli di attività enzimatica, che, a 0,06 µg di proteina, è circa il doppio rispetto al controllo (**Figura 25**).

Nelle stesse condizioni sperimentali, la presenza di ATP (50mM), riporta i livelli di attività ai valori del controllo; che rimangono inalterati anche in seguito all'aggiunta di quantità maggiori di actina. La presenza del cofattore (ATP), probabilmente, induce la polimerizzazione della proteina (endoesogena), che in questa forma non viene più poli-ADPriboseilata (**Figura 25**).

L'analisi elettroforetica ed il successivo immunoblotting delle frazioni citoplasmatiche incubate con differenti concentrazioni di ATP evidenzia che la concentrazione di 50mM del nucleotide induce la polimerizzazione di tutta l'actina endogena. Un analogo effetto si ottiene in presenza ed assenza di ATP dopo trattamento per l'attività della PARG (**Figura 26**).

Alla luce di questi risultati, è possibile ipotizzare che, nel sistema nervoso centrale di *Octopus vulgaris*, la poli-ADPriboseilazione svolge un ruolo

regolatorio nei confronti della polimerizzazione e depolimerizzazione dell'actina.

Quando la proteina è modificata, è stabilizzata nella forma G, mentre la sua de-ADPriboseilazione ne induce la polimerizzazione.

Per la prima volta nel sistema esaminato, pertanto, è stata dimostrata una correlazione tra la poli-ADPriboseilazione dell'actina e le variazioni strutturali (monomero>polimero) della proteina..

Il fatto che l'attività della v-PARP stabilizzi l'actina nella sua forma monometrica e che questa piccola proteina sia implicata nell'organizzazione strutturale del citoscheletro e, a livello neuronale, delle sinapsi, permettono di ipotizzare che l'ADP-riboseilazione dell'actina nel SNC di Octopus rappresenti un fine sistema di controllo della disponibilità di questa proteina per la formazione delle sinapsi, e, quindi, indirettamente, della trasmissione degli impulsi nervosi. Questi risultati sono di particolare interesse in quanto rappresentano il primo esempio in letteratura del coinvolgimento della v-PARP nella regolazione di un evento fisiologico diverso dal ruolo ipotizzato nel processo di detossificazione del citosol, quando l'enzima si trova associato alle particelle vaults.

In prospettiva, si intende studiare il ruolo svolto dalla modificazione per ADPriboseilazione dell'actina nel sistema di trasmissione dei segnali e nei processi di memoria a breve e lungo termine.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Young J.Z.. (1971) “ The Anatomy of Nervous System of *Octopus vulgaris*”. Ed. Clarendon, 1-506.*
- 2) Wells M.J. (1978) “ *Octopus* ”. Ed. Chapman e Hall, 13-18.
- 3) Sanders G.D. (1975) “ Invertebrate Learning”, 1-101.
- 4) Gray E.G. (1970) The fine structure of vertical life of *Octopus* brain Phil. Trans. R. Soc. Lond. B., 379, 379-394.
- 5) Hochner B., Brown E.R., Langella M., Shomrat T., Fiorito G. (2003) A learning and memory area in the *Octopus vulgaris* brain manifests a vertebrate-like long-term potentiation. J. Neurophys., 90, 3547-3554.
- 6) Montalcini R.L., “La Galassia della Mente ” Ed. Baldini & Castoldi , 46-58.
- 7) BurkleA. (2001) Physiology and pathophysiology of poly (ADP-ribosyl)ation. Bio. Essays, 23, 795-806.*
- 8) Althaus F.R., Richter C. (1987) ADP-ribosylation of proteins : enzymology and biological significance. Spinger –Verga Berlin, 3, 125.
- 9) Rouleau M., Aubin R.A., Poirier G.G. (2004) Poly (ADP)ribosylated chromatin domains: access granted J. Cell. Science, 117, 815-825.
- 10) Berger N.A. (1985) Poly (ADP-ribose)in the cellular response to DNA damage. Radiat. Res. 101, 4-15.
- 11) Beghammer M., Ebner M., Markesteiner R., Aver B. (1999) pADPRT-2 : a novel mammalian polymerizing (ADP-ribosyl) transferase generelated to truncated pADPRT homologues in plants and caenorhabditis elegans. FEBS letter 449, 259-263.
- 12) Augustin A., Aplou A. C., Ménissier–de Murcia F., Piel J., Schmit M.. (2003) PARP3 localizes preferentially to the daughter centriole and interferes with the G1/S cell cycle progression. J. Cell. Sci., 116, 1551-1562.
- 13) Smith e coll. (2000) The world according to PARP. Curr. Biol. 10, 1299-1302.*
- 14) Meli E., Pangallo M., Baronti R., Chiarugi A., Cozzi A. Pellegrini Giampietro D.E., Moroni F. (2003) Poly (ADP-ribose) polymerase as a key player in excitotoxicity and post-ischemic brain damage. Toxic Lett. 139, 153-162.*

- 15) Kickhoefer V.A., Siva Amara C., Kedersha N.L., M. Inman E., Ruland C., Rome L.H. (1999) The 193-kD vault protein, vPARP is a novel poly (ADP-ribose) polymerase. *J. Cell. Biol.*, 146, 917-928.*
- 16) Di Cosmo A., Paolucci M., Di Cristo C. (2004) N-methyl-D-Aspartate receptor-like immunoreactivity in the brain of *Sepia* and *Octopus*. *J. Comp. Neurol.*, 477, 202-219.
- 17) Cohen-Armon M., Visochek L., Katzoff A., Levitan D., Klein R., Valbrun M., Schwartz J.H. (2004) Long-term memory requires polyADP-ribosylation. *Science*, 304, 1820-1822.
- 18) Stephen A.G., Raval-Fernandez S., Torres M., Kickhoefer V.A., Rome L.H. (2001) Assembly of vault-like particles in insect cells expressing only the major vault protein. *J. Biol. Chem.*, 276, 23217-23220.
- 19) Vasu S.K., Rome L.H. (1995) Dictyostelium vaults disruption of the major protein reveals growth and morphological defects and uncovers a new associated protein. *J. Biol. Chem.*, 270, 16588-16594.*
- 20) Kedersha N.L., Heuser J.E., Chugani D.C., Rome L.H. (1991) Vault ribonucleoprotein particles open into flower-like structure with octagonal symmetry. *J. Cell. Biol.*, 112, 225-235.*
- 21) Zon A.V., Mossink M.H., Schoester M., Scheffer G.L., Scheper R.J., Wiemer E.A.C. (2001) Multiple human vault RNAs. *J. Biol. Chem.*, 276, 37715-37721.*
- 22) Kong Lawrence B., Siva Amara C., Kickhoefer V.A., Rome L.H., Stewart Phoebe L. (2000) RNA location and modelling of a WD40 repeat domain within vault. *RNA Society*, 6, 890-900.*
- 23) Kickhoefer V.A., Poderycki M.J., Chan E.K.L., Rome L.H. (2002) The La RNA-binding protein interacts with the vaults RNA and is a vault associated protein. *J. Biol. Chem.*, 277, 41282-41286.*
- 24) Yu Z., Fotouhi-Aroakani N., Wu L., Maoui M., Wang S., Banville D. (2002) PTEN associates with the vaults particles in HeLa cells. *J. Biol. Chem.*, 277, 40247-40252.
- 25) Kickhoefer V.A., Liu Y., Kong Lawrence B., Snow Bryan E., Stewart Phoebe L., Harrington L., Rome L.H. (2001) The telomerase vault associated protein Tvp1 is

- required for vault RNA stability and its association with the vault particle. *J. Cell. Biol.*, 152, 157-164.*
- 26)** Harrington L., Mc Phail T., Mar V., Zhou W., Oulton R., EST Program A., Arruda I., Robinson Murray O. (1997) A mammalian telomerase-associated protein. *Science*, 275, 973-977.
- 27)** Schroeijers Anouk B., Siva Amara C., Scheffer G.L., De Jong M.C., Scheper R.J.. (2000) The Mr 193,000 vault protein is up-regulated in multidrug-resistance cancer cell lines. *Cancer Research*, 60, 1104- 1110.
- 28)** Eichenmüller B., Kedersha N., Solovyeva E., Everley P., Lang J., Himes R. H., Suprenant K.A.. (2003) Vaults bind directly to microtubules via their caps and not their barrels. *Cell. Motility and the Cytoskeleton*, 56, 225-236.*
- 29)** Bradford M.M. (1976) A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- 30)** De Lucia F., Faraone Mennella M.R., Quesada P., Farina B. (1996) The poly-ADPRibosylation system in transcriptionally active rat testis chromatin testis. *J. Cell Biochem.*, 63, 334-341.
- 31)** Nicholas R.H., Goodwin G.H.(1982) In “The HMG Chromosomal Protein”. Ed. Acad. Press, 41-67.
- 32)** Adamietz R., Rudolph.(1984) ADP-ribosylation of nuclear proteins in vivo. Identification of Histone H2B has a major acceptor for mono-and poly(ADP-ribose) in dimethylsulfate-treated hepatoma AH7974 cells. *J. Biol. Chem.*, 259, 6841-6846.
- 33)** Hassa O.P., Hottinger M.O. (2008)The diverse biological roles of mammalian PARPs, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases. *Frontiers in Bioscience*, 13, 3046-3082.*
- 34)** Ying W., Seigny M.B., Chen Y., Swanson R.A. (2001) Poly (ADP-ribose) glycohydrolase mediates oxidative and exitotoxic neuronal death. *PNAS*, 98, 12227-12232.*
- 35)** EL Bachir A.Caspase-3- mediated processing of poly (ADP-ribose) glycohydrolase during apoptosis. (2001) *J. Biochem.*, 276, 2935-2942.

- 36) Meyer-Ficca M.L., Meyer R.G., Coyle D.L., Jacobson E.L., Jacobson M. K. (2004) Human poly (ADP-ribose) glycohydrolase is expressed in alternative splice variants yielding isoforms that localize to different cell compartments. *Exp Cell. Res.*, 297, 521-532.*
- 37) Meyer R.G., Meyer-Ficca M.L., Whatcott C.J., Jacobson E.L., Jacobson M. K. (2007) Two small enzyme isoforms mediate mammalian mitochondrial poly (ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) activity. *Exp Cell. Res.* 313 (13), 2920-2936.
- 38) Matusani M., Nakagama H., Sugimura T. (2003) Poly (ADP)ribose and carcinogenesis. *Genes, chromosomes and Cancer*, 38, 339.
- 39) Gagné J.P., Hendelz M.J., Droit A., Poirier G.G. (2006) The expanding role of poly (ADPribose) metabolism : current challenges and new perspectives. *Current Opinion in Cell Biology*, 18, 145-151.
- 40) Bonicalzi M.E., Vodenicharov M., Coulombe M., Gagné J.P., Poirier G. (2003) Alteration of poly (ADPribose) glycohydrolase nucleocytoplasmic shuttling characteristics upon cleavage by apoptotic proteases *Biol. Cell.*, 95, 635-644
- 41) Haince J.F., Ouellet M. E., McDonald D., Hendzel M.J., Poirier G.G. (2005) *Biochem. Biophys. Acta Mol. Cell Research*.
- 42) Ohashi S., Kanai M., Hanai S., Uchimi F. , Maruta H., Tanuma S., Miwa M. (2003) Subcellular localization of poly (ADP-ribose)glycohydrolase in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 307, 915-921.*
- 43) Bakondi E., Bai P., Szabo E., Hnuyadi J., Gergely P., Szabo C., Virag L. (2002) Detection of poly (ADP- ribose) polymerase activation in oxidatively stressed cells and tissue using biotinylated NAD substrate. *J. Histochem. Cytochem.* 50, 91-98.
- 44) Zhang J., Valina L., Dawson L., Dawson M., Snyder S.. (1994) Nitric oxide activation of poly (ADP- ribose) synthase in neurotoxicity. *Science* 263, 687-689.
- 45) Chiarugi A. (2005) Poly (ADP-ribosyl)ation and stroke. *Pharmacological Research* 52, 15-24.
- 46) Mandir A.S., Przedborski S., Jackson-Lewis V., Wang Z. e coll.. (1999) Poly (ADP-ribose) polymerase activation mediates 1-methyl-4-phenil-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)- induced parkinsonism *PNAS* 96(10), 5774-5779.
- 47) Kinoshita T., Nakanishi I, Warizaya M., Iwashita A., Kido Y., Hattori K., Fujii

- T..(2004) Inhibitor- induced structural changes of the active site of human poly (ADP-ribose) polymerase. *FEBS Letters* 556, 43-46.
- 48)** Shiokawa D., Maruta H., Tanuma S. (1997) Inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase suppress nuclear fragmentation and apoptotic-body formation during apoptosis in HL-60 cells. *FEBS Letters* 413, 99-103.
- 49)** Tentori L., Portena I., Graziani G. (2002) Potential clinical applications of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors. *Pharmacological Research*, 45, 73-85.
- 50)** Skaper S.D. (2003) Poly (ADP-ribosyl)ation enzyme-1 as a target for neuroprotection in acute central nervous system injury. *Current Drug Targets-CNS and Neurological Disorders*, 2, 279-291.
- 51)** Ying W., Swanson R. A. (2000) The poly (ADP-ribose) glycohydrolase inhibitor gallotannin blocks oxidative astrocyte death. *Neuroreport*, 11, 1385-1388.
- 52)** Koh D. W., Patel C.N., Oliveira M. A., Jacobson M. K. (2003) Identification of an inhibitor binding site of poly (ADP-ribose) glycohydrolase. *Biochemistry*, 42, 4855-4863.*
- 53)** Bernardi R., Rossi L., Poirier G.G., Scovassi I. (1997) *Biochimica et Biophys. Acta* , 1338, 60-68.
- 54)** D'Amours D., Desnoyer S., D'Silvia I., Poirier G.G. (1999) Poly (ADPribosyl)ation reaction in the regulation of nuclear functions. *J. Biochem.*, 342, 249-268.
- 55)** van Zon A., Mossink M. H., Schoester M., Houstsmuller A. B., Scheffer G. L., Scheper R. J., Sonneveld P., Wiemer E. A. C. (2003) The formation of vaults-tubes : a dynamic interaction between vaults and vault PARP *J. Cell Science*, 116, 4391-4400.*
- 56)** Siva A.C., Raval-Fernandes S., Stephen A. G., LaFemina M. J., Scheper R. J., Kickhoefer V. A., Rome L. H. (2001) Up-regulation of vaults may be necessary but not sufficient for multidrug resistance. *J. Cancer*, 92, 195-202.
- 57)** Stephen A. G., Raval-Fernandes S., Huynh T., Torres M., Kickhoefer V. A., Rome L. H. (2001) Assembly of vault-like particles in insect cells expressing only the major vault protein. *J. Biol. Chem.*, 276, 23217- 23220*.
- 58)** Slesina M., Inman E. M., Moore A. E., Goldhaber J., Rome L. H., Volknandt W., (2006) Movement of vault particles visualized by GFP-tagged major vault protein.

- Cell Tissue Res, 324, 403-410.
- 59)** Herrmann C., Volkandt W., Wittich B., Kellner R., Zimmermann H. (1996) The major vault protein(MVP 100) is contained in cholinergic nerve terminals of electric organ. *J. Biol. Chem.*, 271, 13908- 13915.
- 60)** van Zon A., Mossink M. H., Houstsmuller A. B., Schoester M., Scheffer G. L., Scheper R. J., Sonneveld P., Wiemer E. A. (2006) Vault mobility depends in part on microtubules and vaults can be recruited to the nuclear envelope. *Exp Cell. Res.*, 312, 245-255.
- 62)** Althaus F.R (1992) Poly ADP-ribosylation: a histone shuttle mechanism in DNA excision repair. *J. Cell. Science*, 102, 663 -670.
- 63)** Panzeter P.L. , Zweifel B., Malanga M., Waser S. H., Richard M., Althaus F.R. (1993) Targeting of histone tails by poly (ADP-ribose). *J. Biochem.*, 268, 17662 – 17664.
- 64)** Pleschke J.M., Hanna E., Klecrkowska H. E., Strohm M. Althaus F.R. (2000) Poly (ADPribosyl)ation binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J. Biol. Chem.*, 275, 40974 -40980.
- 65)** Holmes K. C., Popp D., Gebhard W., Kabsch W. (1990) Atomic model of the actin filament. *Nature*, 347, 44-49.
- 66)** Becker EW. (2006) The roles of ATP in the dynamics of the filaments of cytoskeleton. *Biol. Chem.*, 387, 401- 406.
- 67)** Oosawa F., Asakura S. (1975) *Thermodynamics of the Polymerization of Protein*. New York: Academic.
- 68)** Carlier M.F., Valentin-Ranc C., Combeau C., Fievez S., Pantoloni D. (1994) Actin polymerization: regulation by divalent metal ion and nucleotide binding ATP hydrolysis and binding of myosin. *Adv Exp. Med. Biol.*, 358, 71-81.
- 69)** Ampe C., Markey F., Lindberg U., Vandekerckhove J., (1988) The primary structure of human platelet profilin : reinvestigation of the calf spleen profiling sequence. *FEBS Lett.*, 228, 17- 21.
- 70)** Obinata T., Nagaoka-Yasuda R., Ono S. Kusano K., Ohtaka Y., Yamashiro S., Okaada K., Abe H. (1997) Low molecular weight G-actin binding proteins involved in the regulation of actin assembly during myofibrillogenesis. *Cell*.

Struct. Funct., 22, 181-189.

- 71)** Carlier MF., Pantaloni D.(1986) Direct evidence for ADP-Pi –F actin as the major intermediate in ATP- actin polymerization. Rate of dissociation of Pi from actin filaments. *Biochemistry*, 25, 211-214.
- 72)** Carlier MF., Pantaloni D., Korn ED. (1987) The mechanism of ATP hydrolysis accompanying the polymerization of Mg -actin and Ca-actin. *J. Biol. Chem.*, 262,3052-3059.
- 73)** Dos Remedios C. G., Chhabra D., Kekic M., Dedova I. V., Tsubakihara M., Berry D.A., Nosworthy N.J. (2003) Actin binding proteins :regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol. Rev.*, 83, 433-473.
- 74)** Terashima M., Shimoyama M., Tsuchiya M (1999) Introduction of NAD decreases fMLP-induced actin polymerization in chicken polymorphonuclear leukocytes- The role of intracellular ADP-ribosylation of actin for cytoskeletal organization. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 47, 615- 620.*
- 75)** Terashima M., Makoto M., Tsuchiya M. (2000) ADP-ribosylation of filamentous actin induces its depolymerisation – the role of ADP-ribosylation in cytoskeletal reorganization. 6th Internet World Congress for Biomedical Sciences.*

* Gli articoli indicati con l’asterisco sono quelli consultati